

УДК 612.273.1:612.015.11

А. И. Назаренко

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ОСТРОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

В литературе есть данные о существовании связи между индивидуальной устойчивостью организма к действию экстремальных факторов и особенностями метаболизма. Это не значит, что у разных индивидуумов имеются качественно различные наборы ферментов, но активность отдельных ферментов и ферментных систем по генетическим причинам должна варьировать от индивидуума к индивидууму [18]. Так отмечено [21], что различные линии крыс отличаются друг от друга содержанием ацетилхолина и активностью ацетилхолинэстеразы в мозге. Обнаружены [18] значительные индивидуальные различия в активности ферментов крови (щелочная фосфатаза, холинэстераза) и тканей (АТФаза сосудистой стенки, обмен пирувата). Приведены данные [5] о различном содержании гликогена в печени и сахара в крови у животных, обладающих различной устойчивостью к действию радиации. Установлено [9], что животные с различной устойчивостью к гипоксической гипоксии отличаются активностью АТФазы в головном мозге. Выявлен [6] различный характер ответных реакций активности ферментов митохондрий и содержания метаболитов энергетического обмена в головном мозге крыс, обладающих различной чувствительностью к гипоксии.

Таким образом, среди особей одного вида могут существовать индивидуумы со значительными отклонениями физиологических и биохимических показателей от средних величин.

В связи с этим в задачу данной работы входило изучение активности некоторых ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК или цикл Кребса) в условиях острой гипоксической гипоксии в тканях животных с различной устойчивостью к гипоксии.

Методика исследований

Эксперименты проведены на 140 половозрелых крысах-самцах, предварительно подвергнутых испытаниям на устойчивость к острой гипоксической гипоксии под вакуумным колоколом («высота» — 12 тыс. м) по методу, разработанному в Институте физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР [2]. После такого отбора в опыты брали представителей крайних групп — высокоустойчивых (ВГ) и низкоустойчивых (НГ) к гипоксии крыс. Отобранных животных подвергали действию острой гипоксии в двух вариантах: 1) «подъем» в течение 1 мин на «высоту» 12 тыс. м, пребывание на этой «высоте» 5—10 мин, «спуск» и декапитация через 1—1,5 мин после «спуска»; 2) двухчасовое пребывание животных в барокамере на «высоте» 9 тыс. м; декапитацию производили через 3—4 мин после «спуска». В гомогенатах печени и больших полушарий головного мозга определяли активность изоцитратдегидрогеназы (ИДГ) и общей малаатдегидрогеназы (МДГ) по методу Нордмана и сотр. в модификации [15]. Активность ферментов определяли количеством (в мкг) формазана, образованного в пробе за 1 ч в расчете на 1 г ткани. Результаты выражали в процентах и в «процентах к контролю» (когда контрольный уровень активности принимается за 100%).

Результаты исследований и их обсуждение

Наиболее важные в энергетическом отношении реакции цикла трикарбоновых кислот катализируются специфическими дегидрогеназами (ДГ), переносящими электроны от соответствующих субстратов на компоненты дыхательной цепи митохондрий; определение активности ДГ позволяет судить об интенсивности отдельных этапов цикла Кребса.

Фермент изоцитратдегидрогеназа осуществляет окисление и одновременное декарбоксилирование изоцитрата с образованием α -кетоглutarовой кислоты. Фермент имеет несколько структурных форм, использующих НАД и НАДФ в качестве кофакторов. НАД-зависимые изоцитратдегидрогеназы локализованы преимущественно в МХ и ядрах клетки; НАДФ-зависимые ИДГ локализованы как в МХ, так и в надсодочной жидкости. Такое внутриклеточное распределение изоэнзимов ИДГ предопределяет исследование общей активности данного фермента в гомогенатах, а не в отдельных клеточных фракциях.

Дегидрирование лимонной кислоты является наиболее чувствительным звеном к снижению парциального давления кислорода в окружающей среде, поскольку именно на уровне лимонной кислоты при недостатке кислорода происходит торможение транспорта водорода от НАДН₂ на цитохромы.

В наших исследованиях основную группу животных составляли крысы, подвергнутые действию острой гипоксической гипоксии под вакуумным колоколом (12 тыс. м). Согласно литературным данным [19], на высоте 7500 и 10500 м уже наблюдаются выраженные реактивные изменения в организме, соответствующие второй и третьей степени тяжести гипоксического повреждения. По другим данным [10] на «высоте» 10500 м кроме значительного снижения парциального давления кислорода в крови и тканях мозга ниже критических величин для ферментных систем отмечается еще и дезоксигенация тканей; в этой ситуации сводится к минимуму реализация компенсаторных реакций организма в целом, и большее значение, очевидно, приобретают особенности внутриклеточных процессов.

Полученные результаты показали, что активность изоцитратдегидрогеназы возрастает как в мозге, так и в печени животных обеих групп, особенно значительно повышение активности данного фермента в больших полушариях головного мозга ВГ крыс (рис. 1). Различия в величинах прироста активности ИДГ, по-видимому, связаны со спецификой метаболических процессов в печени и мозге. В печени наряду с реакциями окислительного фосфорилирования некоторое количество АТФ образуется в процессе гликолиза; в головном мозге почти единственным источником АТФ являются окислительные реакции цикла трикарбоновых кислот, а запускает реакции в цикле — изоцитратдегидрогеназа. Данные литературы, касающиеся активности ИДГ при гипоксии, весьма противоречивы. В большинстве работ отмечено ингибирование активности этого фермента и вообще всех ферментов цикла Кребса [11, 17]. В то же время есть данные [3] и о повышении активности всех ферментов ЦТК при острой гипоксической гипоксии. Авторы считают, что несмотря на дефицит кислорода потребность в нем на первых порах возрастает, ибо появляется первоочередная необходимость в обеспечении энергией тех систем организма, которые осуществляют борьбу за кислород. Иного «выхода» при острой гипоксии нет, ибо ткани пока еще не приспособились к низкому уровню дыхания, который достигается тренировкой. Потребность в кислороде при острой гипоксии, видимо, значительно выше той, которая необходима для обеспечения возросшей активности сердеч-

ной и дыхательной мускулатуры. Очевидно, при острой гипоксии на ограниченном отрезке времени организм мобилизует «аварийный механизм защиты — неспецифическую резистентность» [1].

Более длительное пребывание ВГ и НГ крыс в условиях гипоксической гипоксии («высота — 9 тыс. м, экспозиция — 2 ч») показало, что активность ИДГ в исследованных тканях животных обеих групп несколько-

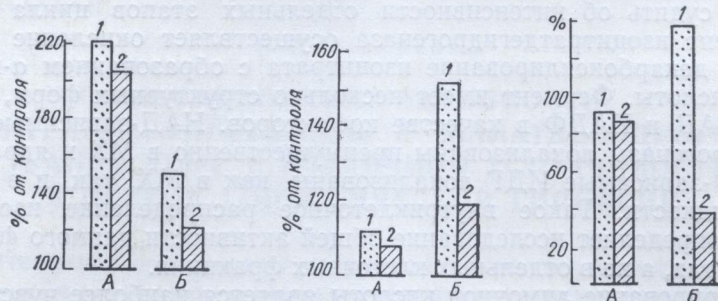


Рис. 1. Активность изоцитратдегидрогеназы (в % от контроля) в мозге (А) и в печени (Б) ВГ (1) и НГ (2) крыс после острой гипоксической гипоксии (12 000 м).

Рис. 2. Активность малатдегидрогеназы (в % от контроля) в мозге (А) и в печени (Б) ВГ (1) и НГ (2) крыс после острой гипоксической гипоксии (12 000 м).

Рис. 3. Активность малатдегидрогеназ (в %) в мозге (А) и печени (Б) ВГ (1) и НГ (2) крыс после подъема в барокамере (9000 м).

ко снизилась (в мозге: у ВГ крыс — на 20%, у НГ крыс — на 12%; в печени: у ВГ крыс — на 10%, у НГ крыс — на 8%). Очевидно, более длительная гипоксия вызывает уменьшение потребления кислорода и усиление анаэробного гликолиза. В особенности это может быть отнесено к мозгу, т. к. при гипоксической гипоксии анаэробные возможности головного мозга имеют первостепенное значение [13].

Многими исследованиями [4, 6] показано, что снижение в клетке концентрации конечного акцептора электронов кислорода, наступающее при высокой степени кислородной недостаточности, приводит к снижению окислительных и преобладанию восстановительных процессов, к значительной активации гликолиза. Но приспособление тканей к условиям острой гипоксической гипоксии может идти не только за счет усиления анаэробного гликолиза. Существует точка зрения, что устойчивость к недостатку кислорода в первую очередь зависит от способности митохондрий захватывать кислород в условиях его сниженной концентрации, степени сопряженности дыхания с фосфорилированием, активности дыхательных ферментов, обеспечивающих восстановление запасов промежуточных акцепторов водорода и только затем от мощности гликолитической системы [8].

Предметом нашего изучения стала еще одна дегидрогеназа — МДГ (малатдегидрогеназа). Это специфический фермент, катализирующий дегидрогенизацию яблочной кислоты с образованием оксалоацетата. МДГ изучена мало; между тем, в свете последних данных [22], этот фермент представляет особый интерес, т. к. превращая щавелевоуксусную кислоту в малат, он берет на себя роль окислителя цитоплазматического НАД·Н. Исследованиями на моллюсках и ракообразных показано [20], что наибольшая устойчивость к гипоксии характеризуется самым высоким отношением малатдегидрогеназы к лактатдегидрогеназе (МДГ/ЛДГ), а наибольшая неустойчивость — самым низким отношением

МДГ/ЛДГ. Авторы пришли к выводу, что между способностью организма к временному анаэробнозису и величинами МДГ/ЛДГ существует прямая зависимость: чем выше это отношение, тем большую выносливость проявляет организм к недостатку кислорода. Литературные данные, касающиеся влияния гипоксии на активность МДГ, немногочисленны и носят противоречивый характер. Одни исследователи [12, 16] обнаруживают увеличение общей активности МДГ тканей после пребывания животных в среде с пониженным содержанием кислорода; другие [7, 14] отмечают снижение ее.

Нашими исследованиями показано, что после испытаний под вакуумным колоколом активность МДГ в ткани печени и мозга возрастает; особенно значительное повышение активности этого фермента было обнаружено в печени ВГ крыс (рис. 2). Более длительное действие гипоксии (2 ч экспонирование животных в барокамере на «высоте» 9 тыс. м) привело к снижению активности МДГ в мозге животных обеих групп и в печени НГ крыс, но в печени высокоустойчивых животных активность этого фермента оставалась достаточно высокой (рис. 3).

Отмеченная нами высокая активность ферментов цикла Кребса (ИДГ, МДГ), как указывалось выше, очень важна в самом начале экстремального воздействия, т. к. способствует выживанию организма в жестких условиях, когда ткани еще не имеют возможности приспособиться к действию новых факторов внешней среды. В условиях более продолжительного действия острой гипоксической гипоксии такая реакция нецелесообразна, поскольку усиленная утилизация кислорода в условиях его дефицита в окружающей среде может привести лишь к развитию более тяжелой тканевой гипоксии. В этой ситуации особо важное значение приобретают возможности анаэробного образования макроэргов (кроме гликолитического пути). Возможно, высокая активность МДГ, выявленная нами у ВГ животных, увеличивает их устойчивость к действию гипоксии, обеспечивая непрерывность реокисления немитохондриальных восстановительных эквивалентов и способствуя процессам, образующим АТФ в анаэробных условиях [4].

Можно предположить, что при действии на организм острой гипоксической гипоксии в начальном периоде ткани приспособляются путем сохранения высокого аэробного метаболизма за счет изменения кинетических констант (митохондриальных) окислительных ферментов, а при увеличении длительности гипоксии метаболизм тканей перестраивается таким образом, чтобы поддержать оптимальный для осуществления функциональной активности уровень энергетических веществ посредством перехода метаболизма на пути, энергетически более выгодные, но менее чувствительные к недостатку кислорода. Возможно, преимущество высокоустойчивых к гипоксии особей, наряду с другими факторами, состоит, в большей активности некоторых ферментов, в способности быстрее изменять эту активность в сложных ситуациях и быстрее переключаться на энергетически более выгодные пути образования макроэргов.

Литература

1. Барбашова З. И. Изменение газообмена как следствие приспособительных сдвигов клеточного дыхания.— В кн.: Газообмен в условиях высокогорья. Сб. научн. трудов Киргиз. мед. ин-та. 1967, 47, с. 42—47.
2. Березовский В. Я. Риси індивідуальності в реакції на гіпоксію.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1975, 21, № 3, с. 371—376.
3. Васильев Г. А., Медведев Ю. А., Хмельницкий В. М. Эндокринная система при кислородном голодании. Л., «Наука», 1974. 167 с.
4. Виноградов В. М. Поддержание жизни в экстремальных условиях.— В кн.: Повышение резистентности организма к экстрем. воздействиям. Кишинев, 1973, с. 105—127.

5. Граевская Б. М., Нечаев И. А., Золотарева Н. Н. О роли гомеостаза в радиочувствительности животных.— Журн. общ. биол., 1975, 36, № 1, с. 135—140.
6. Дудченко А. М. Активность ферментов митох. и содержание метаболитов энергетич. обмена в коре гол. мозга крыс, обладающих различной чувствительностью к гипоксии. Автореф. канд. дис., М., 1976. 30 с.
7. Ещенко Н. Д., Путилина Н. Г., Голубев А. Г., Осадчая Л. М. Изменение активности НАД и НАДФ—специфичных малатдегидрогеназ при кислородной недостаточности в различных тканях.— Вopr. мед. химии, 1975, 21, № 1, с. 73—77.
8. Захаревский А. С., Смелянская Г. Н., Саксонов П. П., Шадурский К. С., Тамарина Н. З., Чумаков В. Н., Юсипова Н. А. К биохимическим механизмам антигипоксического действия амхлорена (диэтиламиноэтиламида параклорфеноксиуксусной кислоты).— Фармакол. и токсикол. 1976, № 1, с. 108—113.
9. Клименко К. С. Влияние гипоксической гипоксии на активность АТФазы в субклеточных фракциях головного мозга высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс.— Оксидотич. и аноксидотич. процессы при эксперим. и клинич. патол., Киев, 1975, с. 105—106.
10. Коваленко Е. А. Некоторые вопросы теории в проблеме гипоксии.— Гипоксия при патол. процессах, выведенных экстремальными воздействиями. Л., 1973, с. 119—120.
11. Лунец Е. Ф., Маслова Г. Т., Ушков А. А. Влияние глубокой циркуляторной гипоксии головного мозга на структуру и функцию митохондрий.— В кн.: Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии. Горький, 1973, с. 38.
12. Носова И. М. Влияние АТФ и кокарбоксилазы на активность малатдегидрогеназы и ее изоферментов в сыворотке крови и мышце сердца.— Бюл. эксперим. биол. и мед., 1975, 80, № 8, с. 48—50.
13. Овсянников Е. Ю., Козлов С. А., Зиновьев Ю. В. Анаэробный гликолиз и устойчивость к кислородному голоданию у кроликов и белых крыс.— Журн. эволюц. биохим. и физиологии. 1976, 12, № 5, с. 434—437.
14. Покровский А. А., Арчаков А. И., Мухамбетова Л. Х. Изменение активности митохонд. ферментов при эксперим. ишемии печени.— Цитология, 1969, 11, № 1, с. 121—125.
15. Путилина Ф. Е., Ещенко Н. Д. Активность некоторых дегидрогеназ цикла Кребса в мозгу, печени и почках.— Вестн. Ленингр. ун-та, 1969, № 21, с. 112—116.
16. Сафонова Т. Я., Юрков Ю. А. Влияние гипоксии на активность изоэнзимов МДГ у новорожденных кроликов.— Вopr. мед. химии, 1972, 17, № 6, с. 631—635.
17. Тамарина Н. З., Захаревский А. С. Влияние гипоксии на активность СДГ и α -кетоглутаратдегидрогеназы в митохондриях головного мозга белых крыс.— В кн.: Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии. Горький, 1973, с. 154—155.
18. Уильямс Р. Биохимическая индивидуальность. М., 1960. 295 с.
19. Чарный А. М. Патопфизиология гипоксических состояний. М., 1961, 343 с.
20. Шапиро А. З., Бобкова А. Н. Роль малатдегидрогеназы беспозвоночных в адаптации к дефициту кислорода.— Журн. эволюц. биохимии и физиол., 1975, 11, № 5, с. 546—547.
21. Bennett E. L., Crossland J., Krech D., Rosenzweig M. R. Strain Differences in Acetylcholine Concentration in the Brain of the Rat.— Nature, 1960, 187, N 4739, p. 787—788.
22. Hochachka P. W., Fields J., Mustafa T. Animal Life Without Oxygen: Basic Biochemical Mechanisms.— American Zoologist, 1973, 13, N 2, p. 543—555.

Отдел физиологии дыхания Института физиологии
им. А. А. Богольца АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
1.VI 1977 г.

A. I. Nazarenko

STUDY OF ISOCYTRATE DEHYDROGENASE AND MALATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN TISSUES OF RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO ACUTE HYPOXIC HYPOXIA

Summary

The experiments were performed on puberal albino male-rats divided into individuals with high (HH) and low-resistance (LR) to hypoxia.

It is shown that after being at a «height» of 12.000 m the activity of IDH in great cerebral hemispheres of the HH rats and the activity of MDH in the liver of the same animals sharply rises. The effect of hypoxia at the «height» equivalent to 9000 m decreases the both enzymes activity in the brain of HH and LH rats as well as in the liver of LH rats; in the liver of HH animals the activity of MDH remains sufficiently high. It is possible that a higher activity of the mentioned enzymes in the tissues of HH rats is one of the reasons of their better bearing of hypoxic hypoxia.