

АКТИВНОСТЬ НАДФ-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ГЛАДКИХ МЫШЦАХ ЖЕЛУДКА У ГОЛУБЕЙ ПРИ НАРУШЕНИИ НЕРВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Как известно, желудочно-кишечный тракт имеет обильную иннервацию, и нервная система регулирует в нем многие физиологические процессы. Однако роль нервной системы в регуляции метаболизма в гладких мышцах желудочно-кишечного тракта изучена недостаточно. В проведенных нами ранее исследованиях было показано, что длительное выключение холинергических влияний приводит к нарушению в мышцах желудка энергетического обмена и, в частности, падению содержания в них макроэргических соединений и изменению активности ряда ферментов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот [8]. В настоящей работе объектом изучения явились НАДФ-зависимые дегидрогеназы, имеющие большое значение для клеточного метаболизма. Это значение определяется прежде всего тем, что они поддерживают на определенном уровне соотношение окисленной и восстановленной форм НАДФ, которые играют важную роль как в реакциях восстановительного синтеза, так и в биоэнергетических процессах [7]. В связи с этим представляет значительный интерес изучение НАДФ-зависимых дегидрогеназ при развитии нейродистрофического процесса в тканях, их участие в возникновении тех разнообразных метаболических сдвигов, которые наблюдаются в органах с нарушенной нервной регуляцией. Исследования, выполненные, главным образом, на денервированных скелетных мышцах, показывают, что активность отдельных НАДФ-зависимых дегидрогеназ (в частности, дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и малатдегидрогеназы) в процессе развития нейрогенной дистрофии может существенно изменяться [1, 10, 13]. Изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы было обнаружено также при развитии нейродистрофического процесса в миокарде [9] и печени [14]. При нарушении нервной регуляции гладких мышц активность указанных ферментов не исследовалась.

Мы изучали активность трех НАДФ-зависимых дегидрогеназ — дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.40) и изоцитратдегидрогеназы (ИДГ, КФ 1.1.1.42) — в гладких мышцах желудка у голубей в норме и при нарушении симпатических и парасимпатических нервных влияний.

Методика. Исследования проводили на голубях. Изучали ферментативную активность в гладких мышцах второго желудка и для сравнения — в скелетной (грудной) мышце. Нарушение парасимпатических влияний достигали блокадой М-холиновых реактивных структур путём подкожного введения голубям раствора сернокислого атропина по 2 мг / 0,1 кг веса 3 раза в сут в течение 3, 7 или 12 дней. Для блокады симпатического отдела нервной системы птицам также в течение 3, 7 или 12 дней вводили внутримышечно раствор резерпина (препарат рауседил венгерской фирмы «Гедесон Рихтер») ежедневно по 0,1 мг / 0,1 кг веса. По истечении указанных сроков птицы были убиты. Контролем служили интактные голуби.

Для изучения активности Г6ФДГ и МДГ скелетные и гладкие мышцы гомогенизировали в 0,15 моль/л растворе KCl, и после центрифугирования гомогената (8000 g, 20 мин) в супернатанте определяли активность ферментов.

Активность ИДГ определяли отдельно в митохондриях и в цитозоле мышечных клеток. Митохондрии выделялись с использованием среды выделения, содержащей 0,05 моль/л трис-HCl буфер (pH 7,4), 0,1 моль/л KCl и 0,001 моль/л $MgCl_2$ [2]. Гомогенаты мышц центрифугировали при 600 g и 2000 g для высвобождения от обломков ядер, клеток и миофибрилл, а затем митохондрии осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин. В полученной при этом надосадочной гомогенате при 12000 g в течение 10 мин. В полученной при этом надосадочной жидкости изучали ферментативную активность, а выделенные митохондрии суспен-

дировались в среде выделения мытые таким образом митохондрии (4—5 мг белка), растирали в роторах при 14000 g 20 мин. активность ИДГ.

Активность НАДФ-зависимых по скорости изменения опти- 340 нм [18, 19, 20]. Белок в ра по степени поглощения ул [6]. Результаты исследований

Результаты и их об
ли, что активность НА-
летных мышц различ
пентозофосфатного цикл

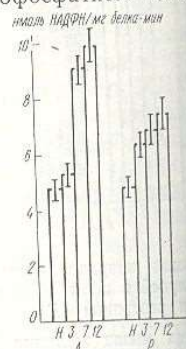


Рис. 1. Активность Г6ФДГ (заштрихованные столбики) ден

Рис. 2. Активность НАДФ грудной мышце (заштрихо 12 дней пос

в грудной мышце (р-
приблизительно вдвое
ным из НАДФ-зависи
(рис. 3). При этом н
цитоплазме и в мит
митохондриях она в 6
ет на себя внимание
мышц почти одинаков
летных мышцах акти
мышцах.

Полученные данн
который относит глад
ткани» — типу, в кот
значение цикла, как
нем образуется НАД
НАДФ-зависимых де
является наименее а
а отношение ИДГ/Г
основным поставщи
цитратдегидрогеназн
скелетной мышцы, т
кой мышце, и отно

Блокада М-хол
на активности изуча

Активность МД
три дня после начал

Физиол. журн., 1984, т. 4

дировались в среде выделения (10 мл/г ткани) и вновь осаждали при 12000 g. Промытые таким образом митохондрии ресуспендировали в среде выделения (1,0 мл/4—5 мг белка), растирали в гомогенизаторе с 0,1% тритоном X-100 и центрифугировали при 14000 g 20 мин. В супернатанте лизированных митохондрий определяли активность ИДГ.

Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ определяли спектрофотометрически по скорости изменения оптической плотности реакционной смеси при длине волны 340 нм [18, 19, 20]. Белок в пробах определялся также с помощью спектрофотометра по степени поглощения ультрафиолетовых лучей при длине волны 260 нм и 280 нм [6]. Результаты исследований обработаны статистически.

Результаты и их обсуждение. Проведенные исследования показали, что активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ в гладких и скелетных мышцах различна. Активность Г6ФДГ — ключевого фермента пентозофосфатного цикла — в гладких мышцах в 5—6 раз выше, чем

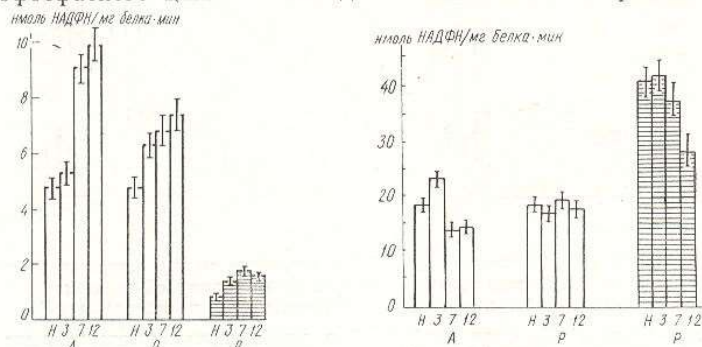


Рис. 1. Активность Г6ФДГ в мышцах желудка (белые столбики) и грудной мышце (заштрихованные столбики) у голубей в норме (Н) и через 3, 7 и 12 дней после введения атропина (А) и резерпина (Р).

Рис. 2. Активность НАДФ-зависимой МДГ в мышцах желудка (белые столбики) и грудной мышце (заштрихованные столбики) у голубей в норме (Н) и через 3, 7 и 12 дней после введения атропина (А) и резерпина (Р).

в грудной мышце (рис. 1). Активность же МДГ в гладких мышцах приблизительно вдвое меньше, чем в скелетной (рис. 2). Самым активным из НАДФ-зависимых ферментов в обеих мышцах является ИДГ (рис. 3). При этом нужно отметить, что активность этого фермента в цитоплазме и в митохондриях гладких мышц очень отличается — в митохондриях она в 6 раз выше, чем в цитоплазме (рис. 4). Обращает на себя внимание то, что активность ИДГ в митохондриях обеих мышц почти одинакова, в то время как в растворимой фракции в скелетных мышцах активность ИДГ почти в 4 раза выше, чем в гладких мышцах.

Полученные данные согласуются с представлениями Лабори [7], который относит гладкие мышцы к «положительному пентозному типу ткани» — типу, в котором хорошо выражен пентозный цикл. Важное значение цикла, как известно, заключается прежде всего в том, что в нем образуется НАДФН. Вместе с тем следует отметить, что среди НАДФ-зависимых дегидрогеназ в гладких мышцах желудка Г6ФДГ является наименее активной. Отношение активности МДГ/Г6ФДГ=4, а отношение ИДГ/Г6ФДГ=10—12. Это свидетельствует о том, что основным поставщиком НАДФН в гладких мышцах является изоцитратдегидрогеназная реакция. В еще большей степени это касается скелетной мышцы, где активность Г6ФДГ гораздо ниже, чем в гладкой мышце, и отношение МДГ/Г6ФДГ=50, а ИДГ/Г6ФДГ=250.

Блокада М-холинореактивных структур существенно отражается на активности изучаемых ферментов в гладких мышцах.

Активность МДГ претерпевает фазные изменения (рис. 2). Через три дня после начала инъекций атропина отмечается небольшое повы-

шение активности фермента, которое к 7 дню сменяется падением ниже исходного уровня и остается таким по выраженности и на 12 день. Можно предположить, что наблюдаемое в первые дни после введения атропина повышение активности МДГ объясняется тем, что атропин, угнетая сократительную активность мышц желудка, обеспечивая их покой и уменьшение энерготрат, может способствовать усилению биосинтетических процессов в мышечных клетках. При этом под влиянием

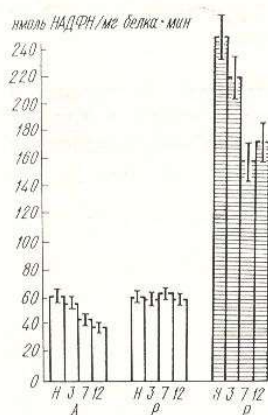


Рис. 3. Активность НАДФ-зависимой ИДГ в цитозоле мышц желудка (белые столбики) и грудной мышцы (заштрихованные столбики) у голубей в норме (Н) и через 3, 7 и 12 дней после введения атропина (А) и резерпина (Р).

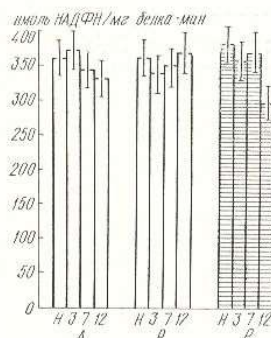


Рис. 4. Активность НАДФ-зависимой ИДГ в митохондриях мышц желудка (белые столбики) и грудной мышцы (заштрихованные столбики) у голубей в норме (Н) и через 3, 7 и 12 дней после введения атропина (А) и резерпина (Р).

МДГ происходит увеличение карбоксилирования малата, который превращается в пируват с одновременным восстановлением НАДФ. И пируват, и НАДФН необходимы для процессов восстановительного синтеза углеводов и липидов.

Однако в более поздние сроки — на 7—12 день после начала введения атропина активность МДГ падает. В этот период начинает сказываться на гладких мышцах длительное выключение холинергических влияний, которое приводит к перестройке обмена веществ. Вероятно, падение активности МДГ связано с уменьшением образования этого фермента.

Блокада холинореактивных структур вызывает падение активности цитоплазматической ИДГ в мышцах желудка (рис. 3). Падение активности ИДГ в цитоплазме, очевидно, также связано с уменьшением ее синтеза в гладкомышечных клетках. Учитывая важную роль ИДГ в образовании восстановленного НАДФ, можно полагать, что количество НАДФ в цитоплазме при этом должно уменьшаться, что может отразиться на течении биосинтетических процессов в гладких мышцах.

В то же время активность митохондриальной ИДГ практически не меняется (рис. 4). По-видимому, это дает возможность клетке в полной мере использовать внутримитохондриальный изоцитрат с образованием НАДФН. Проведенные нами ранее исследования показали, что длительное введение атропина приводит в гладких мышцах желудка у голубей к уменьшению энергетического заряда системы адениновых нуклеотидов и угнетению ферментов цикла трикарбоновых кислот [8]. Поскольку падение активности дегидрогеназ в цикле Кребса, вероятно, сопровождается уменьшением восстановленного НАД, то в этих условиях для клетки может возрасти значение трансгидрогеназной реакции, т. е. переноса водорода с НАДФН на НАД, что создает возможность для дальнейшего окисления водорода в дыхательной цепи и восполнения энергетических ресурсов клетки. Сохранение высокой

активности ИДГ в митохондриях протеканию трансгидрогеназы.

Иначе, чем другие НАД-зависимые ферменты, активность которых в гладких мышцах существенно повышается при введении атропина, совпадают с наблюдениями в гладких мышцах, показавших, что при введении атропина падает активность МДГ и К этому можно добавить, что падение активности НАДФ-киназы [16]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при введении атропина падает активность МДГ и К этому можно добавить, что падение активности НАДФ-киназы [16].

Имеются также данные, что Г6ФДГ находится под контролем АТФ ингибирует Г6ФДГ. Известно, что обнаруженное в желудке при введении атропина повышение активности Г6ФДГ.

Полученные нами данные позволяют прийти к заключению, что повышение активности Г6ФДГ является, по-видимому, защитной реакцией на нервную регуляцию. Если для денервированной ткани увеличение активности Г6ФДГ способствует восстановлению НАДФН. Восстановленные НАДФН, которые могут быть использованы в денервированной энергетического потенциала, что может быть перенесено на дыхательную цепь [3, 4], в которых атомы кислорода восстанавливаются (с помощью лактата) мощью малатдегидрогеназы. Это так, то образующийся малат может поступать в митохондрии, где, являясь НАДФ-зависимой дегидрогеназой, повышает активность ферментов цепи, компенсируя энергетический дефицит после начала введения атропина.

Проведенные исследования показывают, что при введении атропина происходит повышение активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ после начала введения атропина.

активности ИДГ в митохондриях должно способствовать активному протеканию трансгидрогеназной реакции.

Иначе, чем другие НАДФ-зависимые ферменты, ведет себя Г6ФДГ. Ее активность существенно и стойко повышается при более, чем трехдневном введении атропина (рис. 1). В этом отношении наши данные совпадают с наблюдениями ряда авторов над денервированной скелетной мышцей, показавших, что после перерезки нерва в мышцах повышается активность Г6ФДГ [1, 10, 15]. При этом было доказано, что увеличение активности Г6ФДГ в скелетной мышце после денервации связано с усилением синтеза фермента, поскольку оно предотвращается введением актиномицина Д [10]. Вероятно, устранение холинергических влияний в гладких мышцах желудка также сопровождается увеличением образования Г6ФДГ. Кроме того, известно, что активность Г6ФДГ определяется соотношением НАДФ/НАДФН в цитоплазме [16]. Полученные нами данные позволяют предполагать, что длительная блокада М-холинореактивных структур приводит к увеличению этого соотношения в гладких мышцах, поскольку, как было отмечено, падает активность МДГ и ИДГ, участвующих в образовании НАДФН. К этому можно добавить, что в денервированных скелетных мышцах отношение НАДФ/НАДФН действительно увеличивается [5], и одной из возможных причин увеличения содержания НАДФ в цитоплазме клеток при нарушении их нервной регуляции может быть повышение активности НАД-киназы [12].

Имеются также данные о том, что внутриклеточная активность Г6ФДГ находится под контролем АТФ, в частности, обнаружено, что АТФ ингибирует Г6ФДГ в зародышах вьюна [16]. Поэтому не исключено, что обнаруженное нами уменьшение содержания АТФ в мышцах желудка при введении атропина [8] может также способствовать повышению активности Г6ФДГ.

Полученные нами данные и имеющиеся в литературе сведения позволяют прийти к заключению, что повышение активности Г6ФДГ является, по-видимому, закономерным процессом в тканях, утративших нервную регуляцию. Если попытаться оценить значение этого явления для денервированной ткани, то нужно прежде всего отметить, что увеличение активности Г6ФДГ (и, соответственно, пентозофосфатного цикла) способствует пополнению запасов цитоплазматического НАДФН. Восстановленный НАДФ необходим для процессов биосинтеза, которые могут быть усилены в денервированных тканях, в частности, в денервированной мышце [17]. Кроме того, при уменьшении энергетического потенциала клетки НАДФН приобретает важное значение как донор атомов водорода, которые через трансгидрогеназную реакцию могут быть переданы НАД и использованы в НАДН-оксидазной системе дыхательной цепи [11]. В последнее время появились работы [3, 4], в которых авторы допускают возможность переноса водорода от восстановленного за счет глюкозо-6-фосфата НАДФ на пируват (с помощью лактатдегидрогеназы) или же оксалоацетат (с помощью малатдегидрогеназы) и без участия трансгидрогеназы. Если это так, то образующийся при восстановлении оксалоацетата малат может поступать из цитоплазмы в митохондрии и там окисляться НАД-зависимой МДГ с образованием НАДН. Таким образом, повышение активности Г6ФДГ помогает клетке в какой-то степени компенсировать возникающие при развитии нейродистрофического процесса нарушения энергетического и пластического обмена.

Проведенные исследования показали также, что выключение симпатической нервной регуляции сказывается на активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в гладких мышцах в меньшей степени, чем устранение холинергических влияний. Отмечается только небольшое повышение активности Г6ФДГ, которое наступает уже через 3 дня после начала введения резерпина, в то время как активность других дегидрогеназ существенно не меняется. Скелетные же мышцы оказа-

лись более чувствительными к утрате симпатических влияний. В них наблюдается значительное повышение активности Г6ФДГ и в более поздние сроки заметно падает активность МДГ и ИДГ.

V. A. Mikhnev

ACTIVITY OF NADP-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN SMOOTH MUSCLES OF PIGEON GIZZARD UNDER DISTURBANCE OF NERVOUS REGULATION

A continuous atropinization of pigeons leads to a rise in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and to a fall in the NADP-malate dehydrogenase and cytoplasmic NADP-isocitrate dehydrogenase activity in the gizzard. The activity of NADP-isocitrate within mitochondria was invariable. A continuous reserpinization of pigeon leads to a slight increase in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the gizzard. But in skeletal muscles it was accompanied by a notable increase in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and a decrease in NADP-dependent malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase activity.

Medical Institute, Kiev

Список литературы

1. Аксёнова В. М. Влияние денервации на особенности функционирования пентозофосфатного цикла красных и белых мышц кроликов.— В кн.: Тез. докл. III Всесоюз. конф. по биохимии мышц. М., 1978, с. 24—25.
2. Викоградов А. Д., Лейкин Ю. Н., Липская Т. Ю. Биохимия митохондрий.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977.—63 с.
3. Головацкий И. Д., Красевич А. Я., Колотницкий А. И. Некоторые механизмы регуляции обмена углеводов при участии НАДФ.— Укр. биохим. журн., 1977, 49, № 3, с. 38—40.
4. Головацкий И. Д. О взаимодействии и регуляции звеньев пентозофосфатного пути обмена углеводов, гликолиза и трикарбонового цикла.— В кн.: Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. Гродно, 1978, с. 41—42.
5. Замосковская Г. А. Влияние утраты нервной импульсации на концентрацию специфических субстратов лактатдегидрогеназы, НАД и НАДФ-зависимых малакдегидрогеназ в скелетных мышцах кролика.— В кн.: Тез. докл. III Всесоюз. конф. по биохимии мышц. М., 1978, с. 72.
6. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии.— М.: Высш. школа, 1971.—312 с.
7. Лабори А. Регуляция обменных процессов.— М.: Медицина, 1970.—383 с.
8. Михнев В. А. Влияние блокады адрено- и М-холинореактивных структур на биоэнергетические процессы в мышцах желудка птиц.— В кн.: Актуальные проблемы современной патофизиологии (К 100-летию со дня рождения А. А. Богомольца). Киев: Наук. думка, 1981, с. 242—244.
9. Новикова Н. А. Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата в сердце при нейрогенном его повреждении.— В кн.: Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. Гродно, 1978, с. 90—91.
10. Разумовская Н. И. Индукция синтеза глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в скелетной мышце, лишённой нервной импульсации.— Биохимия, 1971, 36, № 4, с. 702—703.
11. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах.— М.: Наука, 1972.—203 с.
12. Телепнёва В. И. Регуляция биосинтеза НАДФ в мышечной ткани.— В кн.: Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция. Гродно, 1978, с. 123—125.
13. Цапко Л. И. Влияние гидрокортизона и денервации на активность НАДФ-специфичной малакдегидрогеназы мышц кролика.— В кн.: Респ. научно-практич. конф. мол. учёных-медиков. Казань, 1974, с. 32—33.
14. Шаныгина К. И., Парфёнова Н. С., Калашикова Н. М. Активность дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата в печени при нарушении её симпатической иннервации.— В кн.: Пентозный путь превращения углеводов и его регуляция. Гродно, 1978, с. 146—147.
15. Щербак Л. Ф. Активность некоторых дегидрогеназ в денервированных скелетных мышцах сусликов в период зимней спячки и при искусственной гипотермии.— Патол. физиология и эксперим. терапия, 1980, № 3, с. 44—46.
16. Юровицкий Ю. Г., Мильман Л. С. Контроль активности дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата стероидными гормонами и НАДФ в развивающемся зародыше мыши.— В кн.: Ферменты в эволюции животных. Л.: Наука, 1969, с. 133—135.
17. Gutmann E. Neurotrophic relations.— Ann. Rev. Physiol., 1976, 38, N 2, p. 177—216.

18. Hsu R. Y., Lardy H. A. Ma Acad. Press, 1969, 13, p. 230—
19. Kornberg A., Horecker B. p. 323—327.
20. Ochoa S. Isocitric Dehydrog 704.

Киев. мед. ин-т

УДК 612.015.34:611—018:616.379—008.64

Г. В. Валуева, В. Н. С

СОДЕРЖАНИЕ В ТКАН ИНСУЛИ

Роль циклических нуклеотидов в связи клетки с нейрогормональной регуляцией. Влияние на организм. Одним из структурных элементов гипоталамуса — гипоталамуса, являющимся фактором — инсулиноподобным фактором, влияющим на стрессорную систему — АКТГ. Кортикотропные физиологические процессы циклической системы [1, 5].

Следовательно, в динамике взаимодействия между нервными и гуморальными факторами, что приводит к изменениям, лежащим в основе их.

В настоящее время, в связи с влиянием инсулина, АКТГ системы, практически отсутствием системы *in vivo* при гормональных факторах. Изучению действия инсулиноподобной системы судились уровни цАМФ в крови, нуклеотида в организме, колебаний, направленность в их основе, а следовательно, процессов, возникших в связи с активностью подробного изучения как циклической системы в разрыве в динамике развития.

Наряду с этим известным нуклеотидом — цГМФ, функции «стратегических» эффектов инсулина, АКТГ и практически отсутствию гуанилатциклазной системы инсулина и АКТГ, что не имеет.

Цель настоящего исследования — изучить цГМФ в печени, гипоталамусе.