

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Научно-теоретический журнал ● Основан в 1955 г. ● Выходит 1 раз в 2 месяца

Том 31, № 1, январь—февраль, 1985

Киев Наукова думка

УДК 591.1/4:577.158.347

А. И. Масюк, М. М. Слободян, Л. Н. Маринова, Г. Д. Бердышев

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ГИПОТАЛАМУСА НА АКТИВНОСТЬ И ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЛАКТАТ- И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ КРЫС

Важная роль гипоталамуса в регуляции метаболизма убедительно доказана многочисленными исследованиями отечественных и зарубежных авторов [4, 10, 14—16, 18]. Однако механизмы, через которые реализуется гипоталамический контроль интенсивности и направленности метаболических процессов в висцеральных органах, остаются мало изученными. Ранее нами было высказано предположение, что в основе внутриклеточных механизмов такой регуляции лежат молекулярные механизмы функционирования генетического аппарата клеток органов и тканей [1, 2, 3, 5].

В настоящем исследовании проведено изучение влияния электростимуляции структур гипоталамуса на активность и изоферментный состав лактат- и малатдегидрогеназ в сердечной мышце крыс. Выбор указанных ферментов обусловлен как их принадлежностью к метаболическим процессам энергетического обеспечения сократительного аппарата миокарда [12], так и особенностями генетической регуляции активности этих ферментов [8].

Методика. Опыты проведены на самцах белых крыс массой 200 г. Биполярные никромовые электроды вводили стереотаксически в паравентрикулярное и вентромедиальное ядра гипоталамуса, используя стереотаксический атлас мозга крыс [17]. При введении электродов и при электростимуляции ядер гипоталамуса животные находились под нембуталовым наркозом (60 мг/кг внутривенно). Электростимуляцию ядер гипоталамуса осуществляли прямоугольными импульсами тока от стимулятора ИСЭ-01. Параметры электростимуляции: длительность импульса 1 мс, частота 60 имп/с, сила тока 0,1 мА, время электростимуляции 60 с. Животных забивали через 1, 5, 30 и 60 мин после электростимуляции структур гипоталамуса. Мозг животных фиксировали в нейтральном 10 % формалине, и на срезах гипоталамуса определяли локализацию электродов. Актиномидин D вводили внутривенно в дозе 20 мкг/кг за 3 ч, пропранолол в дозе 10 мг/кг внутривенно, атропин в дозе 10 мг/кг подкожно за 30 мин до электростимуляции структур гипоталамуса. Норадреналин вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) определяли в растворимой фракции, полученной в результате центрифугирования гомоген-

натов сердечной мышцы на 0,25 М сахарозе при 5000 г в течение 30 мин на холоду. Для исследования общей активности ЛДГ и МДГ использовали инкубационную смесь, состоящую из 2,7 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера, pH 10,0, 0,15 мл 0,5 М малата или лактата натрия; 0,15 мл $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л НАД; 0,03 мл супернатанта. Пробы инкубировали 1 ч при 37 °С. Реакцию останавливали охлаждением. Активность ферментов выражали в условных единицах оптического поглощения при E_{340} на мг белка ($E_{340}/\text{мг}$). Электрофорез ЛДГ и МДГ проводили, как описано нами ранее [9]. Электрофореграммы денситометрировали с помощью специально изготовленного приспособления к регистрирующему спектрофотометру «Specord UV VIS» и на микроденситометре ИТ-7608.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 показано изменение активности лактат- и малатдегидрогеназ в сердечной мышце крыс после электростимуляции паравентрикулярного и вентромедиального ядер

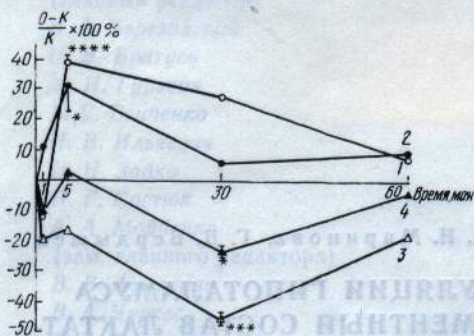


Рис. 1. Изменение активности ЛДГ (1, 3) и МДГ (2, 4) в сердечной мышце крыс при электростимуляции паравентрикулярного (1, 2) и вентромедиального (3, 4) ядер гипоталамуса.

O—K/K $\times 100\%$ — разность в процентах между подопытными и контрольными животными. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$; $n = 8-14$.

гипоталамуса. Электростимуляция этих структур гипоталамуса приводила к различным изменениям активности исследуемых ферментов. При электростимуляции паравентрикулярного ядра наблюдалось повышение активности ЛДГ и МДГ, тогда как при электростимуляции вентромедиального ядра, напротив, было отмечено снижение активности ферментов. Максимальное увеличение активности ЛДГ и МДГ (на 39,3 и 30,9 % соответственно) зарегистрировано спустя 5 мин после электростимуляции паравентрикулярного ядра гипоталамуса. При электростимуляции вентромедиального ядра максимальное снижение активности ферментов (на 45,6 и 23,4 % соответственно) наблюдалось через 30 мин. Через 60 мин после электростимуляции структур гипоталамуса активность исследуемых ферментов в сердечной мышце подопытных животных приближалась к характерной для соответствующего контроля.

Изменение общей активности ЛДГ и МДГ в сердечной мышце крыс при электростимуляции структур гипоталамуса сопровождалось изменениями и в их изоферментном составе, причем характер этих изменений был также различен при электростимуляции паравентрикулярного и вентромедиального ядер гипоталамуса. На рис. 2 представлены результаты исследований изоферментного состава лактат- и малатдегидрогеназ в сердечной мышце крыс в период максимально выраженных изменений общей активности ферментов — через 5 мин после электростимуляции паравентрикулярного и через 30 мин после электростимуляции вентромедиального ядер гипоталамуса. Оказалось, что через 5 мин после электростимуляции паравентрикулярного ядра гипоталамуса активность ЛДГ-1 уменьшается на 25,3 %, а активность ЛДГ-3 и ЛДГ-4 несколько повышается (на 14,0 и 9,5 % соответственно). Изменений в изоферментном составе МДГ при этом не обнаружено. Через 30 мин после электростимуляции вентромедиального ядра гипоталамуса активность ЛДГ-1, напротив, увеличилась на 36,0 %, а активность ЛДГ-3 уменьшилась на 30,5 %. Изменение соотношения изоферментов МДГ в сердечной мышце крыс через 30 мин после электростимуляции вентромедиального ядра гипоталамуса определялось увеличением на

27,7 % активности изофермента МДГ-2 и уменьшением на 27,3 % активности изофермента МДГ-1.

Если исходить из представлений о молекулярных механизмах катализа реакции взаимного превращения лактата и пирувата [6], то уменьшение активности изофермента ЛДГ-1 и увеличение активности ЛДГ-3 и ЛДГ-4, отмеченное нами при электростимуляции паравентрикулярного ядра гипоталамуса, отражает смещение катализируемой ЛДГ реакции в сторону образования лактата, т. е. свидетельствует об усилении процесса гликолиза. Увеличение активности ЛДГ-1 и уменьшение

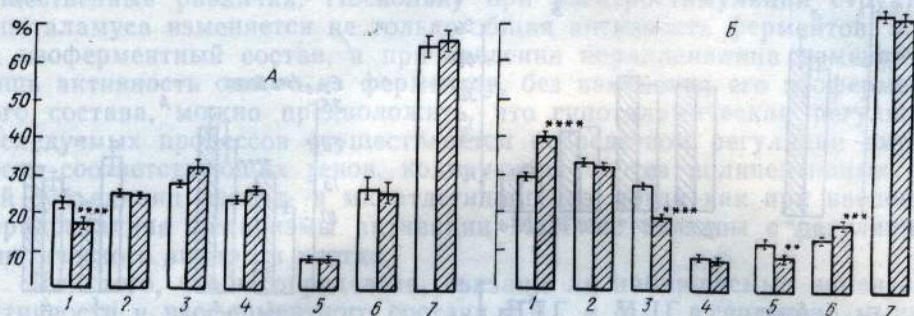


Рис. 2. Изменение изоферментного состава ЛДГ (1—4) и МДГ (5—7) в сердечной мышце крыс через 5 мин после электростимуляции паравентрикулярного (А) и через 30 мин после электростимуляции вентромедиального (Б) ядер гипоталамуса.

Светлые столбики — контроль, заштрихованные — электростимуляция. 1 — ЛДГ-1; 2 — ЛДГ-2; 3 — ЛДГ-3; 4 — ЛДГ-4; 5 — МДГ-1; 6 — МДГ-2; 7 — МДГ-7; $n=8-14$. По вертикали — уровень изофермента, %.

активности ЛДГ-3 отмеченное при электростимуляции вентромедиального ядра гипоталамуса, отражает смещение реакции в сторону образования пирувата, что, следовательно, можно рассматривать как свидетельство активации цикла трикарбоновых кислот. В пользу этого заключения следует отнести и данные об изменении изоферментного состава МДГ в сердечной мышце крыс через 30 мин электростимуляции вентромедиального ядра гипоталамуса.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о важной роли гипоталамических механизмов в регуляции интенсивности и направленности энергетического обмена в сердечной мышце крыс.

Поскольку активность ферментов и их изоферментный состав в сердечной мышце крыс изменяются вскоре после электростимуляции структур гипоталамуса (через 5—30 мин), логично предположить, что гипоталамическая регуляция исследуемых процессов осуществляется через нервнопроводниковые пути, а не через механизмы гормональной регуляции. Это предположение нашло подтверждение в серии экспериментов с фармакологической блокадой холин- и адренергических механизмов. Результаты экспериментов показали, что введение животным блокатора холинергических механизмов атропина, а также β -адреноблокатора пропранолола устраняет наблюдаемые эффекты электростимуляции структур гипоталамуса на активность ЛДГ и МДГ в сердечной мышце. При этом следует отметить некоторые особенности действия нейроблокаторов. Так, изменение активности ЛДГ в сердечной мышце крыс при электростимуляции паравентрикулярного и вентромедиального ядер гипоталамуса предотвращается введением животным атропина и пропранолола, что, следовательно, указывает на вовлечение в процесс гипоталамической регуляции активности ЛДГ холин- и адренергических механизмов. Такая же закономерность наблюдается для МДГ при электростимуляции вентромедиального ядра. Однако при электростимуляции паравентрикулярного ядра гипоталамуса отмеченное увеличение активности МДГ в сердечной мышце исчезает при введении атропина, но сохраняется при введении пропранолола, что свидетельствует в данном случае о холинергической природе гипоталамической регуляции активности МДГ. Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что

паравентрикулярное ядро гипоталамуса развивается из парасимпатических нейробластов и в процессе постнатального развития животных сохраняет свою холинергическую природу [11].

Атропин и пропранолол, блокирующие холин- и адренергические механизмы передачи нервных импульсов, способны сами по себе оказывать влияние на характер метаболических процессов в клетках висцеральных органов и тканей. Для того чтобы определить, не связан

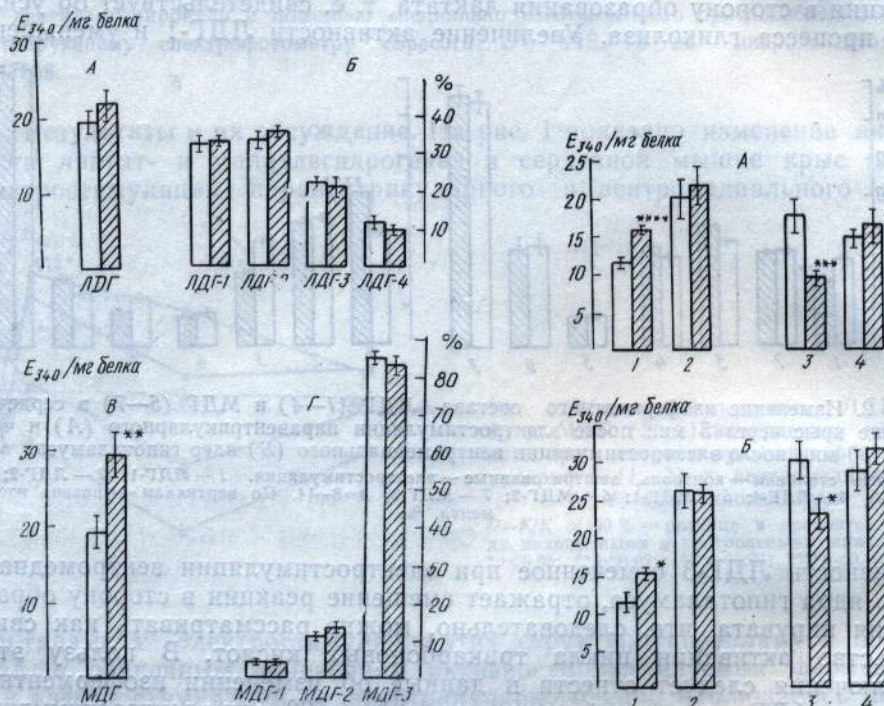


Рис. 3. Активность (А, В) и изоферментный состав (Б, Г) ЛДГ (А, Б) и МДГ (В, Г) в сердечной мышце крыс через 30 мин после введения норадреналина ($n=12$).

Рис. 4. Активность ЛДГ (А) и МДГ (Б) в сердечной мышце крыс после электростимуляции паравентрикулярного (1, 2) и вентромедиального (3, 4) ядер гипоталамуса на фоне введения актиномицина D (2, 4). Без актиномицина D — (1, 3), $n=8-12$.

ли отмеченный нами эффект устранения влияний электростимуляции структур гипоталамуса на активность и изоферментный состав ЛДГ и МДГ в сердечной мышце при блокаде холин- и адренергических механизмов с непосредственным влиянием атропина и пропранолола на метаболизм миокарда, мы сочли необходимым провести исследование влияния этих фармакологических препаратов на активность и изоферментный состав ЛДГ и МДГ в сердечной мышце в отдельной серии опытов.

Результаты этих исследований показали, что ни атропин, ни пропранолол в дозе 10 мг/кг не изменяют активность и изоферментный состав ЛДГ и МДГ в сердечной мышце крыс в течение первых 30 мин после их введения животным. Таким образом, в условиях наших экспериментов атропин и пропранолол, блокируя передачу гипоталамических сигналов к сердечной мышце через холинергические и адренергические механизмы, не влияют при этом на исследуемые метаболические процессы.

Так как при электростимуляции структур гипоталамуса регуляция активности и изоферментного состава лактат- и малатдегидрогеназ в сердечной мышце крыс осуществляется с участием адренергических механизмов, представляло интерес провести исследование влияния экзогенного норадреналина на изучаемые процессы. Эти эксперименты показали, что через 30 мин после введения животным норадреналина в

дозе 10 мг/кг в сердечной мышце подопытных крыс по сравнению с соответствующим контролем наблюдается увеличение активности на 34,4 % лишь одного из исследуемых ферментов — МДГ (рис. 3). Активность ЛДГ и изоферментный состав ЛДГ и МДГ при этом не изменяются. Эти данные мы склонны рассматривать как свидетельство того, что адренергические механизмы регуляции активности и изоферментного состава ЛДГ и МДГ в сердечной мышце крыс при электростимуляции структур гипоталамуса и при введении норадреналина имеют существенные различия. Поскольку при электростимуляции структур гипоталамуса изменяется не только общая активность ферментов, но и их изоферментный состав, а при введении норадреналина изменяется лишь активность одного из ферментов, без изменения его изоферментного состава, можно предположить, что гипоталамическая регуляция исследуемых процессов осуществляется посредством регуляции активности соответствующих генов, кодирующих синтез полипептидных цепей субъединиц лактат- и малатдегидрогеназ, тогда как при введении норадреналина механизмы активации МДГ не связаны с регуляцией генетического аппарата клетки.

Для того, чтобы определить, связаны ли наблюдаемые изменения активности и изоферментного состава ЛДГ и МДГ в сердечной мышце крыс при электростимуляции структур гипоталамуса с активностью генетического аппарата, нами проведено исследование активности этих ферментов и изоферментного состава ЛДГ в сердечной мышце крыс при введении животным ингибитора транскрипции — актиномицина *D*. Результаты этой серии экспериментов показали (рис. 4), что актиномицин *D*, введенный животным за 3 ч до электростимуляции гипоталамуса полностью устраняет наблюдаемые изменения в активности ферментов и в изоферментном составе ЛДГ как при электростимуляции паравентрикулярного, так и вентромедиального ядер гипоталамуса. На основании этих данных можно предполагать, что гипоталамическая регуляция активности ферментов и изоферментного состава ЛДГ в сердечной мышце крыс реализуется через молекулярно-генетические механизмы на этапе транскрипции.

A. I. Masyuk, M. M. Slobodyan, L. N. Marinova, G. D. Berdyshev

EFFECT OF HYPOTHALAMUS STIMULATION ON THE ACTIVITY AND ISOENZYMIC COMPOSITION OF LACTIC AND MALIC DEHYDROGENASES IN THE RAT MYOCARDIUM

The activity and isoenzymes of lactic and malic dehydrogenases were examined in the heart of rats after the hypothalamus stimulation. The activity of the LDG and MDG in the heart increased after stimulation of the paraventricular nuclei of the hypothalamus, but decreased after stimulation of the ventromedial nuclei. An increase or a decrease of the LDG and MDG in the heart after the hypothalamus stimulation were abolished by the prior injection of actinomycin D. This fact is a basis for conclusion about the important role of the genetic apparatus of cardiac muscle cells in the neurohormonal regulation of the heart metabolism.

Institute of Physiology at State University, Kiev

Список литературы

1. Бердышев Г. Д., Тюленев В. И., Масюк А. И., Слободян М. М. Нервная система и генетический аппарат клеток. — Цитология и генетика, 1975, 9, № 2, с. 138—141.
2. Бердышев Г. Д., Масюк А. И., Тюленев В. И. О нервной регуляции генетических процессов. — Успехи соврем. биологии, 1978, 86, 1/4, с. 43—54.
3. Бозач П. Г., Бердышев Г. Д., Масюк А. И., Тюленев В. И. Влияние электростимуляции гипоталамуса на синтез РНК в печени крыс. — Физиол. журн. СССР, 1979, 65, № 8, с. 1226—1230.
4. Макаренко А. Ф., Динабург А. Д. Межуточный мозг и вегетативная нервная система. Киев: Наук. думка, 1971.—323 с.
5. Масюк А. И. Исследование процесса транскрипции в ядрах клеток печени крыс при