

Действительный член АМН СССР А. И. СТРУКОВ, Р. А. СИМАКОВА,  
академик АН УССР Е. Б. БАБСКИЙ, Е. В. БОГДАНОВА

### ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАЗНЫЕ ФАЗЫ СЕРДЕЧНОГО ЦИКЛА

Для раскрытия механизма процессов сокращения мышечных волокон сердца весьма важным является одновременное комплексное изучение функциональных, метаболических и структурных изменений, происходящих в разные фазы сердечной деятельности. Непрерывное чередование сокращения и расслабления сердца делает необходимым применение специальных методов исследования, позволяющих фиксировать структурные и метаболические изменения в сердечной мышце в разные фазы ее сократительного цикла. Для этой цели применялась фармакологическая остановка сердца в систоле или в диастоле (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>), холодное замедление ритма сердечных сокращений, облегчающее выбор момента замораживания (<sup>3</sup>) и др. Наибольшую точность исследования при сопоставлении функциональных, структурных и химических изменений во время одиночного сокращения сердца обеспечивает методика быстрого автоматического замораживания ткани миокарда в любой заданный момент цикла (<sup>4</sup>, <sup>5</sup>). При использовании этой методики были выявлены существенные, четко соответствующие фазам сердечного цикла, изменения в содержании в миокарде макроэргических фосфорных соединений, неорганического фосфата, гликогена, молочной кислоты, сульфгидрильных групп, а также активности некоторых гликолитических ферментов (<sup>6-9</sup>).

Целью настоящего исследования было проследить изменения активности ряда окислительно-восстановительных ферментов гистохимическими методами в разные фазы сердечного сокращения. Исследовалась активность дегидрогеназ молочной, яблочной, янтарной, лимонной, глютаминовой кислот, дегидрогеназ  $\alpha$ -глицерофосфата и глюкозо-6-фосфата, а также активности НАД- и НАДФ-диафораз и цитохромоксидазы в начале и в конце систолы, в начале и в конце диастолы сердца травяной лягушки. Быстрое замораживание желудочка сердца производилось автоматически с помощью кардиосинхронизатора ФРК-61, управляемого биоэлектрическими импульсами с исследуемого сердца. В наших экспериментах зубец R электрограммы выполнял функцию управляющего сигнала, включающего через регулируемый интервал времени замораживающее устройство. Последнее представляло собой серебряный термод, заполненный жидким азотом. Термод располагался над сердцем и удерживался в настороженном состоянии с помощью пружинного устройства. Электрическое напряжение, разряжаемое сердцем во время зубца R электрограммы, которое отводило от обнаженной поверхности сердца лягушки, вызывало включение с помощью кардиосинхронизатора, в заданный момент времени, замораживающего устройства. При этом заполненный жидким азотом термод освобождался, падал на сердце и мгновенно его замораживал. Момент замораживания отмечался по обрыву электрограммы.

Замораживание сердец лягушек производилось в начале или в конце систолы и в начале или в конце диастолы. Срезы замороженных желудочков готовили в криостате толщиной в 10—12  $\mu$ . Затем срезы инкубировали в соответствующих инкубационных средах. На серийных срезах каждого

сердца проводилось определение активности всех перечисленных выше дыхательных ферментов. Кроме того, часть срезов фиксировалась и окрашивалась гематоксилином и эозином.

Изучение препаратов с иммерсионной системой при увеличении  $970\times$  позволило выявить отчетливые различия в степени активности каждого из изучавшихся энзимов в указанные стадии сердечного цикла. Помимо количественного различия, выявлявшегося интенсивностью реакции, обращало на себя внимание различие в локализации ферментов в течении цикла, что проявлялось в различном расположении и распределении, а также и в различном размере гранул формазана.

Образовавшиеся в участках локализации ферментативной активности гранулы формазана располагались вдоль миофибрилл в виде нескольких цепочек. При этом в каждой цепочке отмечалось то или иное количество рядов, состоящих из гранул формазана, лежащих в нескольких плоскостях.

Для получения более точных данных мы в каждом отдельном наблюдении подсчитывали число цепочек в мышечном волокне и число рядов гранул формазана в каждой цепочке, отмечая плотность расположения гранул, их величину и обращая внимание на фон.

Число рядов в цепочке и число самих цепочек было различным для различных групп ферментов и для одного и того же фермента в различные стадии сердечного цикла.

При сравнительном изучении активности всех указанных ферментов в ткани сердца лягушки было выявлено, что наиболее высока по сравнению с другими энзимами активность НАД и НАДФ-диафораз во всех фазах сердечного цикла. Высокая активность НАД- и НАДФ-диафораз проявлялась большим числом цепочек в каждом мышечном волокне и большим числом рядов гранул формазана в каждой цепочке (см. рис. 1 на вкл. к стр. 477). Дегидрогеназы янтарной, яблочной и молочной кислот имеют несколько меньшую активность. Сравнительные данные суммарной активности изучавшихся ферментов, условно выраженные количеством крестов, представлены в табл. 1.

При изучении активности НАД- и НАДФ-диафораз было отмечено, что во время систолы число рядов в цепочке меньше и плотность распределения гранул ниже, чем во время диастолы. Размер гранул очень мелкий. Почти вышедшие гранулы были с трудом различимы даже с иммерсионной системой. Наличие мелких пылевидных гранул создавало впечатление легкого затуманенного фона. Одиночные гранулы местами были немного крупнее.

В диастоле число рядов в цепочке возрастало. Гранулы становились более четкими, часть из них выделялась на общем фоне своими более крупными размерами. Число рядов в цепочке во время систолы для НАД-диафоразы было 5—8, в диастоле число их возрастало до 10—12. Для НАДФ-диафоразы цифры были соответственно 2—3 и 5—6. При сравнении морфологических картин, наблюдавшихся при переходе от одной стадии сердечного цикла к другой, не отмечалось скачкообразных изменений. Это

Таблица 1

Сравнительная интенсивность реакции (степень активности) выявления энзимов в желудочке сердца лягушки

| Фермент                                | Суммарная интенсивность реакции |
|--|---------------------------------|
| НАД-диафораза                          | ×××××                           |
| НАДФ-диафораза                         | ×××××                           |
| Дегидрогеназа янтарной кислоты         | ××××                            |
| Дегидрогеназа яблочной кислоты         | ××××                            |
| Дегидрогеназа молочной кислоты         | ××××                            |
| Цитохромоксидаза                       | ××××                            |
| Дегидрогеназа $\alpha$ -глицерофосфата | ×××                             |
| Дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата        | ×××                             |
| Дегидрогеназа глютаминовой кислоты     | ×××                             |
| Дегидрогеназа лимонной кислоты         | ××                              |

позволяет предположить, что энергетические процессы, имеющие место в функционирующем миокарде, протекают плавно.

При изучении изменений активности дегидрогеназы янтарной кислоты в различные фазы сокращения миокарда желудочка можно было отметить следующее: во время систолы в мышечном волокне обычно обнаруживалось до 5—6 цепочек, в которых располагалось 1—2 ряда гранул. Сами гранулы распределялись свободно: расстояние между отдельными гранулами формазана соответствовало размерам 3—6 таких гранул. В диастоле несколько увеличивалось число цепочек (до 8) и немного увеличивалось число рядов (до 2—3). Гранулы располагались ближе, теснее. Расстояние между гранулами становилось равным размерам 1—2 гранул. Сами гранулы были более крупными.

При изучении активности дегидрогеназы яблочной кислоты было обнаружено, что в систоле число цепочек в мышечном волокне достигает 9—10. Большинство цепочек состояло из одного ряда мелких, нежных гранул формазана, располагавшихся на чистом фоне, и лишь единичные цепочки состояли из 2—3 рядов. Во время диастолы пылевидные гранулы располагались более компактно, на расстоянии друг от друга, равном размеру одной гранулы, число цепочек в большинстве волокон доходило до двух (см. рис. 2 на вкл. к стр. 477).

Аналогичные изменения в распределении гранул формазана были отмечены и при исследовании остальных ферментов, за исключением дегидрогеназы лимонной кислоты. При исследовании этой дегидрогеназы мы наблюдали обратное соотношение: более высокая активность фермента была в систоле, а в диастоле число и плотность распределения гранул формазана были ниже. Своеобразные картины были отмечены при изучении активности дегидрогеназы  $\alpha$ -глицерофосфата и молочной кислоты. Гранулы формазана в определенные стадии сердечного цикла образовывали характерные фигуры: гранулы располагались в виде полуколец, колец, в виде своеобразных червячков и запятых.

Таким образом, гистохимическое исследование активности дегидрогеназ янтарной, яблочной, лимонной, молочной, глутаминовой кислот, дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и  $\alpha$ -глицерофосфата, НАД- и НАДФ-диафаз, цитохромоксидазы показало, что в разные стадии сердечного цикла меняется активность всех этих ферментов. Вероятнее всего, что эти изменения энзиматической активности обусловлены ионными сдвигами, связанными с возбуждением и сокращением, и действием продуктов энзиматического расщепления используемых клеткой веществ. Полученные данные коррелируют с результатами биохимических исследований, проведенных ранее (<sup>1-9</sup>).

Институт нормальной и патологической физиологии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
31 XII 1970

Институт морфологии человека  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> М. Д. Гедеванишвили, Сборн. Физиология и патология серд-сосудистой системы, Тбилиси, 1965, стр. 40. <sup>2</sup> М. Д. Гедеванишвили, Некоторые показатели обмена веществ в миокарде во время систолы и диастолы. Кандидатская диссертация, Тбилиси, 1966. <sup>3</sup> Г. Бекмухамедов, ДАН, 154, № 3, 735 (1964). <sup>4</sup> А. Н. Медеяновский, В. А. Фролов и др., Физиол. журн. СССР, 48, № 10, 1277 (1962). <sup>5</sup> А. Н. Медеяновский, В. А. Фролов и др., Сборн. Фазовый метод изучения и управления функциями сердечно-сосудистой системы, 1963, стр. 71. <sup>6</sup> Е. В. Бабский, Е. В. Богданова, ДАН, 171, № 3, 750 (1966). <sup>7</sup> Е. В. Богданова, Сборн. Физиология и патология кровообращения, 1967, стр. 43. <sup>8</sup> Е. В. Богданова, Тез. докл. II Всесоюзн. биохим. съезда, 1969, секция № 9, стр. 24. <sup>9</sup> Ю. Е. Бабская, Е. В. Богданова, Е. В. Бабский, ДАН, 177, № 5, 1240 (1967).