

В. А. БРУМБЕРГ

**ВЛИЯНИЕ ГИСТОТОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА АКТИВНОСТЬ
ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В НЕЙРОНАХ
И НЕЙРОГЛИИ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 2 I 1973)

Представления о существовании множественных форм ферментов (изоферментов, или изозимов) значительно углубляют понимание механизмов ферментативной активности. За последние годы большое внимание уделяют анализу изоферментов и в нервной ткани (¹).

Можно предполагать, что существование ферментов в множественных формах является одним из путей тонкой регуляции тканевого метаболизма. Вероятно, неодинаковая чувствительность отдельных изоферментов к различным стрессорным воздействиям, биоактивным веществам, промежуточным продуктам клеточного обмена веществ и т. д. создает для клеток возможность более дробного, легче регулируемого метаболического ответа на изменение условий протекания внутриклеточных биохимических реакций.

Такая неоднородность функциональных сдвигов внутри молекул фермента, обладающего множественными формами, могла бы быть выявлена при стрессорных воздействиях, в частности при гипоксии. Представляло интерес сопоставить эти изменения активности изоферментов в разных отделах нервной системы, поскольку литературные данные свидетельствуют о неодинаковой чувствительности, например, филогенетически более молодых и филогенетически более древних клеточных структур центральной нервной системы к гипоксии (²). Наконец, внутри каждого отдела ц.н.с. было интересно сравнить ферментативные сдвиги в нейронах и в их глиальных клетках-сателлитах, так как предыдущий опыт цитофотометрического исследования системы нейронов — нейроглии, а также многочисленные литературные данные (^{3, 4}) убеждают в том, что функционально-метаболический ответ нейронов и клеток глии может, в зависимости от конкретных условий воздействия, быть либо сходным, либо весьма различным.

Это и составило задачу настоящей работы. В качестве объекта исследования была выбрана лактатдегидрогеназа (ЛДГ; α -лактат: НАД-оксидоредуктаза, КФ. 1.1.1.27) — один из ключевых ферментов клеточного окислительного метаболизма. ЛДГ относится к числу наиболее хорошо изученных ферментов; в частности, детально исследовано строение ее пяти изоферментов (^{5, 6}).

Опыты были проведены на белых беспородных мышах весом 28—30 г. Гистотоксическую гипоксию вызывали внутрибрюшинным введением раствора KCN (10 мг на 1 кг веса). Через 5—10 мин. после введения такой дозы у мышей наблюдали нарушение координации движения, неравномерное дыхание, судорожные явления; большинство животных принимало боковое положение. Мышей декапитировали, быстро извлекали кору мозжечка и шейный отдел спинного мозга вместе с прилежащими спинальными ганглиями и немедленно замораживали в смеси петролейного эфира с сухим льдом (-120°). Общую активность ЛДГ и отдельные компоненты фермента в нейронах и нейроглии определяли с помощью

цитохимического метода Броуди в модификации Жеребцова (⁷⁻⁹). Метод основан на том, что в присутствии избытка субстрата избирательно угнетается активность изоферментов ЛДГ, быстро мигрирующих при электрофорезе (F-ЛДГ, соответствующих преимущественно Н-субъединицам ЛДГ), тогда как добавление мочевины угнетает активность изоферментов ЛДГ, медленно мигрирующих при электрофорезе (S-ЛДГ, соответствующих главным образом М-субъединицам ЛДГ).

Таблица 1

Отношение активности Н-формы к М-форме ЛДГ в нейронах и их глии

Отдел ц.н.с.	Нейрон	Глия
Кора мозжечка	0,53±0,042	0,61±0,049
Передние рога спинного мозга	0,58±0,038	0,53±0,032
Спинальный ганглий	0,60±0,044	0,76±0,048

Срезы толщиной 7 м, приготовленные в криостате при t от -26 до -28° , инкубировали 40 мин. в термостатированных кюветах при 37° . Реакцию проводили с субстратом в присутствии НАД ($10^{-2} M$) с трис-HCl-буфером (pH 7,4); использовали тетразолий тетранитросиний, растворенный в диметилсульфоксиде; объем инкубационной среды — 3 мл. Для выявления общей ЛДГ и F-ЛДГ добавляли лактат Na в концентрации 0,1 M; при определении S-ЛДГ в инкубационную среду вводили избыток субстрата (лактат Na 0,72 M), а для обнаружения F-ЛДГ добавляли 2,61 M мочевины. Контролем служила инкубационная среда без субстрата. После проведения реакции срезы фиксировали в 10% нейтральной формалине в течение 2—3 час., промывали в дистиллированной воде и заключали в глицерин-желатину. Оптическую плотность клеток определяли на микроспектрофотометре МУФ-5 (¹⁰) при 560 мμ. Показана прямая пропорциональная зависимость между оптической плотностью клеток и концентрацией в них формазана (по разному времени инкубации срезов одинаковой толщи) (^{11, 12}), что позволяет проводить количественный цитофотометрический анализ всех компонентов ЛДГ в отдельных клетках. Распределение красителя в клетке было достаточно гомогенным: при сканировании клеток колебания оптической плотности внутри одной клетки оказались менее 10%, т. е. не превышали общей ошибки цитофотометрического метода. Это подтвердило и контрольное измерение оптической плотности клеток Пуркинье мозжечка мышей при гистотоксической гипоксии с помощью одноволнового и двухволнового метода цитофотометрии. Был получен однозначный результат: увеличение оптической плотности F-форм фермента при тканевой гипоксии на 40% (двухволновой метод) и 35% (одноволновой метод при 560 мμ). Совпадение результатов позволило в дальнейшем использовать только одноволновой способ цитофотометрии.

Для определения количества формазана (в относительных единицах) в расчете на одну клетку вычисляли объемы цитоплазмы нейронов и тел глиальных клеток по формуле эллипсоида вращения. Линейные размеры клеток измеряли с помощью окуляр-микрометра МОВ-1-15^x на тех же препаратах, которые подвергали фотометрированию.

Показано, что в исследованных отделах ц.н.с. количественное соотношение быстро и медленно мигрирующих компонентов ЛДГ в нейронах практически такое же, как и в соответствующих глиальных клетках-сателлитах, несколько отличаясь в разных отделах (табл. 1).

В двигательных нейронах передних рогов спинного мозга и чувствительных нейронах спинальных ганглиев гистотоксическая гипоксия приводила к активации только одной медленно мигрирующей (более активной в анаэробных условиях) формы фермента (S-ЛДГ). В нейроглиальных же клетках, окружающих данные нейроны, изменений не было. В клетках Пуркинье мозжечка (одного из наиболее чувстви-

тельных к недостатку кислорода отделов ц.н.с. (2)) повышалась активность только быстро мигрирующей (более активной в аэробных условиях) формы ЛДГ, а в глиальных клетках-сателлитах активировались обе формы фермента (рис. 1).

Исследования, посвященные влиянию гистотоксической гипоксии на метаболизм мозга *in vivo*, немногочисленны. Введение цианистого натрия животным приводило к изменению энергетического обмена головного мозга: снижению активности цитохромоксидазы, содержания АТФ, фосфокреатина, гликогена, увеличению концентрации молочной кислоты, фосфолипидов, неорганического фосфата и т. д. (13, 14). Содержание и относительная удельная радиоактивность фосфора фосфолипидов в головном мозгу крыс при гистотоксической гипоксии значительно уменьшались по сравнению с контрольными животными (15).

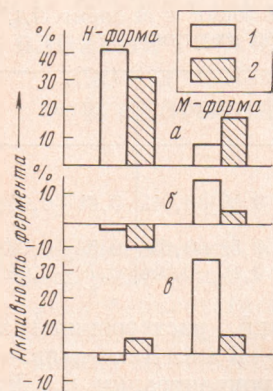


Рис. 1. Изменения активности Н- и М-формы лактатдегидрогеназы в нейронах (1) и их глии (2) разных отделов ц.н.с. мышей при гистотоксической гипоксии. а — мозжечок, б — спинной мозг, в — спинальный ганглий

Гемическая гипоксия, вызванная введением крысам нитрита натрия, сопровождалась увеличением общей активности ЛДГ в тканях головного мозга (кора больших полушарий и подкорковый слой), печени, почек. Активность отдельных молекулярных форм при этом не определяли (16).

Изменения изоферментного спектра ЛДГ головного мозга были исследованы лишь в условиях гипоксической гипоксии. Так, на 20 и 30 день тренировки крыс к длительной гипоксической гипоксии в ткани головного мозга наблюдали активирование медленно мигрирующих компонентов ЛДГ₄ и ЛДГ₅ (электрофоретическое разделение гомогената ткани в агаровом геле) (17). В ткани головного мозга крыс, прошедших ступенчатую адаптацию к «высоте» 7000 м, выявлено активирование фракций ЛДГ, связанных с аэробным метаболизмом, а в ткани печени, напротив, более выражены были анаэробные формы ЛДГ (18). Эти данные трудно сравнивать с нашими результатами ввиду различий в механизмах конкретных форм гипоксии и неодинаковых методических подходов. Определение активности изоферментов ЛДГ в гомогенате ткани, состоящем из клеточных элементов, различающихся по метаболическим свойствам и реакции на внешние воздействия, по-видимому, не адекватно при исследовании отдельных нейронов и клеток глии.

Работ по изучению сдвигов изоферментного состава ЛДГ в клетках нервной ткани при гистотоксической гипоксии в доступной нам литературе мы не нашли. Наблюдаемые нами изменения изоферментного состава ЛДГ, по-видимому, являются результатом сложного сочетания как первичного метаболического ответа тканевых структур на гипоксическое воздействие, так и компенсаторных приспособительных реакций. Это сочетание первичных и вторичных реакций может быть неодинаковым в нервных и глиальных клетках различных отделов ц.н.с. Полученные данные, несомненно, свидетельствуют о функциональной неоднородности отдельных молекулярных форм фермента.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
2 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Брумберг, Л. З. Певзнер, Усп. совр. биол., 74, 2 (5), 213 (1972).
- ² Эд. Ван Лир, К. Стикней, Гипоксия, М., 1967.
- ³ В. А. Брумберг, Л. З. Певзнер, Цитология, 13, 2, 129 (1971).
- ⁴ Л. З. Певзнер, Функциональная биохимия нейроглии, Л., 1972.
- ⁵ Дж. Уилкинсон, Изоферменты, М., 1968.
- ⁶ В. И. Яковлева, Усп. биол. хим., 9, 55 (1968).
- ⁷ J. A. Brody, Nature, 201, 685 (1964).
- ⁸ J. A. Brody, K. Engel, J. Histochem., 12, 9, 687 (1964).
- ⁹ M. A. Gerebzoﬀ, C. R. Soc. biol., 160, 6, 1323 (1966).
- ¹⁰ Ф. М. Бахирев, М. И. Давыдова и др., Цитология, 6, 1, 114 (1964).
- ¹¹ G. R. Jones, Exp. Cell Res., 43, 268 (1966).
- ¹² Т. В. Крестинская, Н. Б. Манусова, Цитология, 11, 1, 126 (1969).
- ¹³ G. Albaum, J. Terregman, O. Bodansky, J. Biol. Chem., 164, 1, 45 (1946).
- ¹⁴ N. S. Olsen, R. Klein, J. Biol. Chem., 167, 3, 739 (1947).
- ¹⁵ Л. М. Антонов, С. В. Гастева, ДАН, 200, № 5, 1229 (1971).
- ¹⁶ Ф. Е. Путилина, Н. Д. Ещенко, Вопр. мед. хим., 17, 2, 161 (1971).
- ¹⁷ И. М. Маркелов, Л. Н. Симановский, ДАН, 182, № 4, 982 (1968).
- ¹⁸ Л. Н. Гринберг, Регуляция дыхания митохондрий при длительной гипокинезии и гипоксии. Автореф. кандидатской диссертации, М., 1972.