

В. И. КУЛИНСКИЙ, Л. В. ТРУФАНОВА

**АКТИВИРОВАНИЕ КАТЕХОЛАМИНАМИ И ЦИКЛИЧЕСКИМ
3',5'-АМФ ЛИМИТИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ЦИКЛА
КРЕБСА — НАД-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

(Представлено академиком С. Е. Северным 5 VI 1975)

Катехоламины (КА) вызывают выраженное увеличение потребления кислорода организмом и отдельными тканями, в том числе печенью (¹⁻⁴). Наибольшее распространение получили гипотезы, рассматривающие этот эффект как вторичный по отношению к накоплению субстратов окисления (¹) или разобщенному действию жирных кислот (^{2, 4}). Тем не менее, механизмы калоригенного действия КА все еще остаются неясными (^{1, 4}). Естественнее предположить, что одной из возможных причин эффекта является активация «узкого места» цикла Кребса — НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) (⁵⁻⁸).

Имеется много данных о том, что калоригенный эффект КА опосредован 3',5'-АМФ (²⁻⁴). Однако точка действия 3',5'-АМФ неизвестна. На очищенной ИЦДГ печени активирующий эффект 3',5'-АМФ был невелик, неспецифичен и наблюдался при нефизиологических концентрациях ($10^{-3} M$) (⁹). Однако такая постановка вызывает серьезные возражения, так как активация ферментов 3',5'-АМФ опосредуется протектиновой и поэтому отсутствует в «слишком чистых» ферментных препаратах (¹⁰). Задача настоящей работы заключалась в реализации этих ранее не применявшихся подходов.

Работа проведена на 76 взрослых и 104 поворожденных линейных мышах обоего пола. КА вводили подкожно: парадrenalалин (НА) в дозе 1,84 мг/кг, изадрин (изопропилнорадреналин) 2,3 мг/кг в расчете на основанное. Печень отмывали от крови и гомогенизировали (1:10) в 0,25 M сахарозе, 1 mM ЭДТА, 10 mM трис-буфере pH 7,5. Из безядерной фракции митохондрий осаждали в течение 20 мин. при 12 000 g. Активность ИЦДГ определяли по (⁵) после обработки митохондрий с помощью 0,1% тритона X-100. В опытах *in vitro* инкубацию проводили в течение 10 мин. при 30° в присутствии $10^{-3} M$ теofilлина (в опытах с НА) и $10^{-3} M$ аскорбата.

Введение КА в небольших дозах вызывало выраженную активацию ИЦДГ печени и увеличение потребления кислорода организмом (рис. 1), при этом в случае изадрина оба эффекта были смещены на более ранние сроки. Это, очевидно, связано с тем, что изадрин, в отличие от вазоконстриктора НА, расширяет сосуды и поэтому всасывается и действует быстрее (¹¹). Важно отметить, что для обоих КА максимум активации ИЦДГ наблюдался раньше, чем пик калоригенного эффекта. Это опережение свидетельствует в пользу значения активации ИЦДГ для повышения потребления кислорода. Правда, этот довод следует рассматривать как косвенный ввиду того, что калоригенный эффект КА на целостном организме связан с другими тканями — в основном жировой и мышечной (^{2, 4}). Возможно, тканевыми особенностями объясняется разная скорость нормализации кривых.

Другой подход к исследованию физиологической роли обнаруженного нами феномена заключается в проведении экспериментов на поворожден-

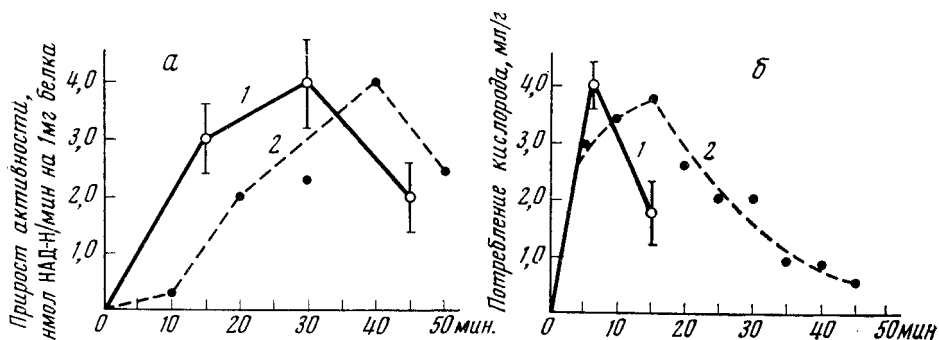


Рис. 1. Временная динамика активации ИЦДГ печени (1) и калоригенного эффекта (2) норадреналина (а) и изадрина (б) у мышей

ных животных, для которых характерны не только большая интенсивность дыхания, но и значительно более высокий калоригенный эффект КА (⁴). Если активация ИЦДГ действительно существенная для увеличения потребления кислорода, то у новорожденных мышей она должна была оказаться более выраженной. Табл. 1 показывает, что такое предположение оправдалось в полной мере. Для новорожденных характерны как более высокая исходная активность, так и намного большая активация фермента при введении НА; последнее обнаруживалось при любом способе выражения результатов: на 1 мг белка митохондрий (табл. 1), на 1 г веса печени и на 1 г веса тела.

Активация ИЦДГ воспроизводилась в опытах *in vitro* при инкубации НА с гомогенатами печени (табл. 2). Однако эффект полностью исчезал в опытах с изолированными митохондриями. Это доказывает, что НА не действует прямо на ИЦДГ и нуждается в каком-то посреднике, удаляемом при дифференциальном центрифугировании. Можно предположить, что таким фактором является система адренорецептор — аденилциклаза,

Таблица 1

Влияние введения норадреналина на активность НАД-изоцитратдегидрогеназы печени мышей СВА разного возраста *

Возраст мышей	Контроль (0,9% NaCl)	Норадреналин 1,84 мг/кг за 30 мин.	Прирост активности	P
Взрослые	12,2±0,4 (14)	16,2±0,7 (8)	4,02±0,76	<0,001
Новорожденные	17,0±1,1 (6)	25,5±0,8 (7)	8,50±1,96	<0,001
P	<0,001	<0,001	<0,01	—

* Активность выражена в нмолях НАД-Н в 1 мин. (мг белка митохондрий); в скобках — число опытов (в 1 опыт брали по 6—10 новорожденных мышей).

локализованная в плазматических мембранах (¹², ⁴). С этим предположением согласуется активирование ИЦДГ 3',5'-АМФ, четко проявлявшееся при его инкубации как с гомогенатом, так и с изолированными митохондриями (табл. 2). Важно подчеркнуть, что эффекты КА и 3',5'-АМФ наблюдались при физиологических концентрациях этих регуляторов. Это позволяет думать о реальной биологической значимости меж- и внутриклеточной регуляции ИЦДГ.

Активация КА и 3',5'-АМФ ИЦДГ представляет большой интерес. Во-первых, она может быть важной причиной калоригенного эффекта экзо-

Таблица 2

Влияние инкубации разных клеточных фракций с норадреналином и циклическим 3,5-АМФ на активность НАД-изоцитратдегидрогеназы митохондрий печени мышей F₁ (СВА×С₅₇В1)

Активатор	Цельный гомогенат (5)	Митохондрии (7)	P (гомогенат — митохондрии)
Норадреналин	+5,60±0,31 <0,001	+0,40±0,47 ≥0,1	≤0,001
3,5-АМФ	+5,70±1,79 <0,05	+4,80±0,87 <0,01	>0,1
P (НА — 3,5-АМФ)	>0,1	≤0,001	—

Примечание. Концентрация норадреналина и 3,5-АМФ 10⁻⁶ М. В скобках — число опытов. Активность выражена в тех же единицах, что и в табл. 1.

и эндогенных КА. Во-вторых, естественно предположить, что и другие гормоны, а также различные экзо- и эндогенные факторы, изменяющие концентрацию 3',5'-АМФ, могут модифицировать активность ИЦДГ и в результате этого — всего цикла трикарбоновых кислот. В-третьих, данная работа показывает, что исследование ключевых ферментов цикла Кребса должно широко применяться при изучении регуляции митохондриального дыхания.

Выражаем искреннюю благодарность Н. Д. Ещенко за обучение методике и Т. В. Авраамовой за предоставление изоцитрата.

Красноярский государственный медицинский институт

Поступило
24 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Himms-Hagen, Pharmacol. Rev., v. 19, 3, 367 (1967). ² В. П. Скулачев, Трансформация энергии в биомембранах, М., 1972, стр. 157. ³ В. И. Кулинский, Пробл. эндокринол., т. 16, 5, 67 (1970). ⁴ J. Himms-Hagen, In: Handb. Exp. Pharmacol., v. 33, 363 (1972). ⁵ H. Goebell, M. Klingenberg, Biochem. Zs., B. 340, 4, 441 (1964). ⁶ A. M. Stein, J. H. Stein, Biochemistry, v. 6, 10, 3197 (1967). ⁷ А. Ленинджер, Биохимия, М., 1974, стр. 404. ⁸ R. C. Hansford, R. N. Johnson, Federat. Proc., v. 33, 5, 1272 (1974). ⁹ G. W. E. Plaut, T. Aogaichi, J. Biol. Chem., v. 243, 1, 5572 (1968). ¹⁰ M. A. Brostrom, E. M. Reimann et al., Adv. Enzyme Regulat., v. 8, 191 (1970). ¹¹ В. И. Кулинский, Пробл. эндокринол., т. 14, 6, 148 (1968). ¹² Y. A. Robison, R. W. Butcher, E. W. Sutherland, Ann. Rev. Biochem., v. 37, 149 (1968).