

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ НАПРЯЖЕНИЕМ КИСЛОРОДА И НАБОРАМИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КРОЛИКОВ

К. С. ДАНИЕЛЯН, Л. Б. БУРНАЗЯН

Исследовано наличие корреляции между напряжением кислорода (pO_2) и процентным содержанием М-субъединиц лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в тканях кроликов. Коэффициент корреляции для связи исследованных параметров $r = -0,93$. Приведены результаты регрессионного анализа для данных по pO_2 и %М ЛДГ в тканях кроликов и крыс: полученные закономерности аналогичны и согласуются с положениями «аэробно-анаэробной» гипотезы о регуляции синтеза мономеров ЛДГ *in vivo*.

К объяснению координации аэробного и анаэробного обмена углеводов в клетке, в частности эффекта Пастера, привлекается множество механизмов. Среди них, наряду с регуляторными процессами на уровнях гексокиназной, фосфофруктокиназной, фосфоглицераткиназной, пируваткиназной реакций, выделяется также лактатдегидрогеназная реакция. Выдвинута «аэробно-анаэробная» гипотеза, согласно которой распределение изоферментов (ИФ) ЛДГ в тканях млекопитающих имеет физиологический смысл, так как соотносится с различными в их кинетических характеристиках [1, 2].

Гипотеза дискутируется. Обсуждаются в основном следующие вопросы: 1. справедливо ли положение о физиологическом смысле разницы в чувствительности ИФ к ингибированию пируватом? 2. действительно ли существует зависимость распределений ИФ ЛДГ в тканях от их кислородоснабжения? 3. каков механизм этой регуляции? Результаты детального исследования кинетики образования abortивных комплексов ЛДГ-НАД-пируват и ЛДГ-НАДН-лактат, представленные Иверсом [3], разрешили высказанные ранее сомнения [4, 5] по поводу первого пункта гипотезы. Однако опубликованные ныне данные [6, 7], не согласующиеся с предполагаемой ролью abortивных тройных комплексов, нуждаются в дальнейшей разработке. Второе положение гипотезы в основном подтверждается. Показана очевидная зависимость скорости синтеза субъединиц М и, соответственно, соотношения содержания Н и М мономеров ЛДГ в культуре клеток и ткани от содержания O_2 в среде культивирования [2, 8, 9]. Кроме того, установлено приспособительное изменение состава ИФ ЛДГ в сторону увеличения пропорции М/Н при различных гипоксических состояниях [10—14].

Несмотря на то что гипотеза разрабатывается во многих лабора-

ториях, мы не встретили в литературе широкого исследования с сопоставлением параметров, между которыми предположена регуляторная связь, характерных для тканей в норме, стационарном состоянии. Исходя из этого, нами ранее были систематизированы и сопоставлены имеющиеся в физиологической и биохимической литературе сведения о топографии pO_2 и распределении ИФ ЛДГ в тканях млекопитающих [15]. Учитывая существенную разноречивость в результатах проведенного корреляционного анализа, мы пришли к выводу о необходимости исследовать наборы ИФ ЛДГ и pO_2 в тканях лабораторных животных в норме, покое с целью выявления наличия или отсутствия корреляции между ними.

Материал и методика. Опыты проводили на кроликах весом 2,5—3,5 кг. Напряжение кислорода определяли полярографическим методом с помощью полярографа ЛР-60 и пары электродов платина ($50 \mu < \varnothing < 60 \mu$)—хлорированное серебро ($1 < \varnothing < 1,5$ мм), с подачей напряжения 0,65—0,75 в [16, 17]. Так как применялся индикаторный электрод открытого типа, результаты измерений выражали в относительных единицах (микроамперах). Процент М-субъединиц рассчитывали на основе данных по изоферментному составу ЛДГ, полученных методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле по Дитцу, Лубрано [18] с незначительными модификациями. Скапирование гелей производили с помощью специальной приставки, приспособленной к прибору Specord UV VES [19].

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены результаты исследований наборов ИФ ЛДГ (а также рассчитанные на основе этих данных значения относительного содержания М-субъединиц) и напряжения кислорода в норме, покое в ряде тканей кроликов. Результаты каждого опыта по полярографическому измерению pO_2 суть средние арифметические из значений, полученных по нескольким точкам ткани данной особи; отметим при этом, что значительного разброса значений pO_2 для одной и той же ткани мы не зарегистрировали. Этот факт согласуется с современными представлениями о гистограмме капиллярной сети, оптимально снабжающей кислородом все участки тканей. Исключения составляют почки, существенно гетерогенные по исследованным параметрам,—по мере продвижения индикаторного электрода от коркового слоя вглубь, к сосочкам, прибор регистрировал постепенное падение pO_2 .

Из табл. 1 виден довольно четкий переход от преобладания анодных фракций, и, соответственно, низкого относительного содержания М-субъединиц ЛДГ в тканях, в которых значения напряжения кислорода оказались наивысшими (сердце, корковый слой почек, камбаловидная /красная/ мышца), к тканям с преобладанием катодных фракций, высоким процентом М-субъединиц и относительно низким pO_2 (печень, большая поясничная мышца /белая мышца/). Эта закономерность оказалась характерной и для одного гетерогенного органа—почек.

Коэффициент корреляции, рассчитанный для установления степени взаимосвязи рассматриваемых нами параметров, $r = -0,93$ (соответствующая кривая на рис. 1). Для сравнения приведена также ана-

Таблица 1

Распределение ИФ ЛДГ (в % ($M \pm m$)) и топография pO_2 (в микроамперах) ($M \pm m$) в тканях кроликов (n — число опытов)

Ткань	ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	% M (n)	pO_2 (n)
Сердечная мышца	66,20 \pm 3,40	22,62 \pm 1,74	10,33 \pm 1,97	0,58 \pm 0,37	0,27 \pm 0,25	11,52 (8)	49,1 \pm 2,14 (9)
Корковый слой почек	42,32 \pm 1,43	30,14 \pm 2,06	21,97 \pm 0,82	4,74 \pm 1,39	0,83 \pm 0,39	22,91 (7)	35,2 \pm 2,03 (9)
Камбаловидная мышца	38,92 \pm 3,65	33,15 \pm 0,88	21,95 \pm 2,20	4,29 \pm 1,83	1,69 \pm 0,99	24,17 (7)	32,9 \pm 1,62 (9)
Мозговой слой почек	32,65 \pm 0,64	25,96 \pm 0,23	27,41 \pm 1,24	11,40 \pm 0,62	2,58 \pm 0,38	31,33 (7)	34,8 \pm 1,79 (7)
Селезенка	27,74 \pm 1,22	32,38 \pm 1,53	25,62 \pm 0,62	11,75 \pm 0,41	2,51 \pm 0,51	32,23 (8)	32,6 \pm 1,44 (9)
Икроножная мышца	19,12 \pm 0,84	19,47 \pm 0,72	20,81 \pm 0,71	22,32 \pm 0,79	18,28 \pm 1,27	50,29 (8)	24,25 \pm 2,0 (9)
Печень	11,54 \pm 0,59	17,30 \pm 0,70	33,88 \pm 0,38	30,32 \pm 1,98	6,56 \pm 1,02	50,96 (8)	21,8 \pm 1,61 (9)
Большая поясничная мышца	7,05 \pm 1,49	9,28 \pm 1,62	13,40 \pm 1,19	30,14 \pm 1,72	40,13 \pm 3,32	71,76 (7)	19,15 \pm 2,28 (8)

логичная кривая для данных по тканям крыс ($\gamma = -0,88$), полученных нами ранее [20] (рис. 2).

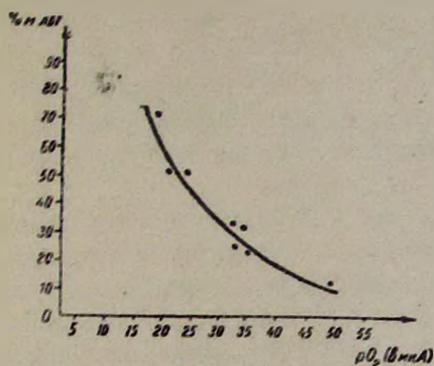


Рис. 1.

Рис. 1. Кривая зависимости %М ЛДГ от pO_2 в тканях кроликов.

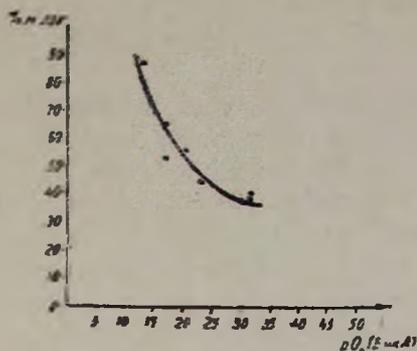


Рис. 2.

Рис. 2. Кривая зависимости %М ЛДГ от pO_2 в тканях крыс.

Учитывая близость γ к -1 , мы подвергли полученные данные регрессионному анализу, применив метод среднего квадратичного отклонения с помощью электронно-вычислительной машины «Наири». Результаты следующие:

а) для данных по тканям кроликов:

$$\text{Уравнение } y = A + ax \text{ при } A = 95,449, \quad a = -1,845 \quad \sigma = 6,759.$$

$$y = A + a_1x + a_2x^2 \text{ при } A = 152,144, \quad a_1 = -5,515, \quad a_2 = 0,0543 \quad \sigma = 4,407.$$

$$y = A + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 \text{ при } A = 363,35, \quad a_1 = -26,499, \quad a_2 = 0,707, \quad a_3 = -0,0064 \quad \sigma = 3,562.$$

$$y = A + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + a_4x^4 \text{ при } A = 318,376, \quad a_1 = -19,75, \quad a_2 = 0,344, \quad a_3 = 0,0019, \quad a_4 = 0,000067 \quad \sigma = 3,564.$$

$$y = Ae^{ax} \text{ при } A = 200,74, \quad a_1 = 0,05799 \quad \sigma = 4,189.$$

$$y = Ae^{a_1x + a_2x^2} \text{ при } A = 207,68, \quad a_1 = -0,06, \quad a_2 = 0,000032 \quad \sigma = 4,162.$$

$$y = Ae^{a_1x + a_2x^2 + a_3x^3} \text{ при } A = 7918,8, \quad a_1 = -0,422, \quad a_2 = 0,0113, \quad a_3 = -0,00011 \quad \sigma = 3,542.$$

$$y = Ae^{a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + a_4x^4} \text{ при } A = 2604,5, \quad a_1 = -0,255, \quad a_2 = 0,0023, \quad a_3 = 0,000095, \quad a_4 = 0,0000017 \quad \sigma = 3,556.$$

б) для данных по тканям крыс:

$$\text{Уравнение } y = A + ax \text{ при } A = 100,778, \quad a_1 = -2,058, \quad \sigma = 7,559.$$

$$y = A + a_1x + a_2x^2 \text{ при } A = 207,555, \quad a_1 = -11,899 \quad \sigma = 4,708.$$

$$y = A + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 \text{ при } A = 476,815, \quad a_1 = -50,921, \quad a_2 = 2,013, \quad a_3 = -0,027 \quad \sigma = 4,254.$$

$$y = A + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + a_4x^4 \text{ при } A = 2018,41, \quad a_1 = -332,264, \quad a_2 = 20,634, \quad a_3 = -0,558, \quad a_4 = 0,006 \quad \sigma = 6,452.$$

$$y = Ae^{ax} \text{ при } A = 121,754, \quad a = -0,038 \quad \sigma = 6,861.$$

$$y = Ae^{a_1x - a_2x^2} \text{ при } A = 492,25 \quad a_1 = -0,166 \quad a_2 = 0,003 \quad \sigma = 4,302.$$

$$y = Ae^{a_1x + a_2x^2 + a_3x^3} \text{ при } A = 7413,1, \quad a_1 = -0,599, \\ a_2 = 0,021, \quad a_3 = -0,00027 \quad \sigma = 3,92.$$

$$y = Ae^{a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + a_4x^4} \text{ при } A = 18 \cdot 10^3, \quad a_1 = -4,647, \\ a_2 = 0,29, \quad a_3 = -0,0078, \quad a_4 = 0,0008 \quad \sigma = 6,256.$$

В обоих случаях все приведенные значения среднего квадратичного отклонения находятся в пределах значений σ , полученных при расчетах σ для рассматриваемых параметров.

Установленная нами закономерность согласуется с представлениями о том, что в процессе онтогенетического развития организмов складываются тканеспецифические наборы ИФ ЛДГ, соответствующие метаболическим потребностям этих тканей, и что, возможно, решающим фактором, определяющим тип спектра в ткани, является ее кислородоснабжение, точнее напряжение O_2 в ней. При этом, по-видимому, лактатдегидрогеназная система довольно лабильна—идет постоянное, сравнительно интенсивное (период полураспада ИФ ЛДГ—4—18 дней, время жизни и-РНК для М-мономеров около 9 часов) обновление наборов в тканях, о чем свидетельствуют результаты исследований скоростей синтеза и деградации ИФ ЛДГ *in vivo* [2, 21, 22]. Следовательно, поддержание определенных тканеспецифических наборов ИФ ЛДГ должно обеспечиваться в известной степени поддержанием стационарных концентраций регуляторных факторов, важных для становления лактатдегидрогеназной системы. Именно исходя из этих соображений, мы исследовали вопрос о том, обеспечивают ли гомеостатические механизмы также поддержание определенных стационарных концентраций кислорода, оптимальных для каждой ткани в данном функциональном состоянии. Как видно из полученных нами данных по оксигенотопографии тканей крыс и кроликов, pO_2 в разных тканях изученных животных в норме, покое существенно различаются. Переход от одних концентраций O_2 в тканях к другим под действием возмущающего фактора (вдыхание смеси воздуха с чистым кислородом) и довольно быстрое (1, 2-минутное) восстановление прежнего уровня pO_2 по прекращении этого воздействия мы наблюдали при испытании чувствительности электродов к кислороду.

Проведенный нами ранее анализ литературных данных обнаружил наличие аналогичных закономерностей в тканях человека ($r = -0,86$), у крыс подобной зависимости не выявлено ($r = -0,23$) [15]. Отмеченная нами [15] противоречивость литературных данных по измерению pO_2 в тканях млекопитающих связана, по-видимому, с отсутствием единой, унифицированной, доступной оптимальной аппаратуры по полярографии. Вместе с тем известно, что гистограммы разных тканей существенно различаются, следовательно, регистрируемые в тканях величины pO_2 должны по-разному зависеть от размеров индикаторного электрода, и истинная картина топографии pO_2 по тканям организмов может быть искажена. Сказанное продемонстрировано Джемисоном

и др. [23], которые установили наличие существенной разницы в изменениях регистрируемых значений pO_2 в разных тканях крыс при переходе от индикаторного электрода диаметром 60 μ к электроду диаметром 330 μ .

Исходя из этого, мы пришли к выводу о необходимости измерения pO_2 одной и той же парой электродов в одних и тех же условиях, в тканях одних и тех же животных. Выбирая оптимальный диаметр электрода, при котором травма ткани минимальна, а стабильность электрода достаточна, мы руководствовались рекомендациями Джемисона и др. [23], согласующимися с мнением Березовского [16]. Полученные нами результаты, точнее закономерность в последовательности тканей крыс и кроликов в порядке убывания величины pO_2 в них согласуется с закономерностью, установленной относительно тканей человека [24] и крыс [23]. Составленная в результате подобных исследований картина оксигенотопографии тканей крыс и кроликов в силу сведения к минимуму эффекта биохимической индивидуальности животных, разницы в параметрах применяемой аппаратуры, на наш взгляд, должна быть ближе к истинной, чем составленная на основе результатов, полученных разными авторами при изучении какой-либо одной ткани. Нужно полагать, что именно это обстоятельство в сочетании с параллельными исследованиями ИФ ЛДГ в тех же тканях, по всей вероятности, и создали возможность для выявления взаимосвязи между напряжением кислорода и относительным содержанием Н и М мономеров ЛДГ, подтверждающей справедливость «аэробно-анаэробной» гипотезы.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 28.VI 1978 г.

**ԹԹՎԱԾՆԻ ԼԱՐՄԱՆ ԵՎ ԼԱԿՏԱՏԴԵԶԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ
ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՄԻՋԵՎ ԺԱԳԱՐՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ
ԵՂԱՄ ԿԱՊԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

Կ. Ս. ԴԱՆԻՆԼՅԱՆ, Լ. Բ. ԲՈՒՌՆԱԶՅԱՆ

Ուսումնասիրված է ճագարների հյուսվածքներում թթվածնի լարման (pO_2) և լակտատդեհիդրոգենազի (ԼԴՀ-ի) Մ-մոնոմերների տոկոսային քանակի միջև կոռելյացիայի գոյություն հարցը: Հետազոտվող պարամետրերի կոռելյացիոն գործակիցը $r = -0,93$: Բերված են ճագարների և առնետների հյուսվածքներում pO_2 -ի և ԼԴՀ-ի % Մ մասին տվյալների վերաբերյալ ռեգրեսիոն անալիզի արդյունքները, ստացված օրինաչափությունները միանման են և համապատասխանում են ԼԴՀ-ի մոնոմերների in vivo սինթեզի կարգավորման մասին «աէրոբ-անաէրոբ» հիպոթեզի գրույթներին:

THE INVESTIGATION OF BOUND BETWEEN OXYGEN TENSION AND LACTATE DEHYDROGENASE ISOZYMES IN RABBIT TISSUES

K. S. DANIELYAN, L. B. BURNAZYAN

The presence of bound between oxygen tension and lactate dehydrogenase isozymes pattern in rabbit tissues has been investigated. The correlation coefficient for a bound of the investigated parameters is $r = -0.93$. The results of regression analysis for pO_2 and $\% M$ LDH data in tissues of rabbit and rats have been given. The received regularities are analogical and agreed with "aerob-anaerob" hypothesis.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Kaplan N. O., Goodfriend T. L. Adv. in Enzyme Regul., 2, 203, 1964.
2. Goodfriend T. L., Sokol D. M., Kaplan N. O. J. Mol. Biol., 15, 18, 1966.
3. Everse J. Dissertatio 1. San-Diego, 1973.
4. Wuntch T., Chen R. F., Vessell E. S. Science, 167, 63, 1970.
5. Wuntch T., Chen R. F., Vessell E. S. Science, 169, 480, 1970.
6. Balley Y. S., Soo Th. L. J. Biol. Chem., 252, 5708, 1977.
7. Wang Chi-Sun Eur. J. Biochem, 78, 569, 1977.
8. Hellung-Larsen P., Andersen V. Exp. Cell. Res. 50, 286, 1968.
9. Rabinowitz V., Dietz A. Biochem and Biophys. acta, 139, 254, 1976.
10. Петрунь Н. М., Тюленева Т. В. Вopr. мед. химии, 18, 76, 1972.
11. Даниелян К. С. Мат. научн. конфер. молодых ученых, посв. XXV съезду КПСС, ЕрМИ, Ереван, 25, 1975.
12. Трофимова Г. А., Барановский А. Ю., Положенцев С. Д. Кардиология, 15, 82, 1975.
13. Brumberg V. A., Pevzner L. Z. Acta histochem., 55, 1, 1976.
14. Messert E. B., Blux A. Sch. Comp. Biochem and Physiol., B53, 73, 1976.
15. Даниелян К. С. Биологический журнал Армении, 27, 11, 1974.
16. Березовский В. А. В сб.: Газообмен в условиях высокогорья. 13, 1967.
17. Руководство по изучению биол. окисления полярографич. методом. М., 1973.
18. Dietz A. A., Lubrano T. Anal. Biochem., 20, 246, 1967.
19. Мовсесян Н. О., Хумарян М. А., Мовсесян С. Г. Лабораторное дело, 7, 445, 1976.
20. Даниелян К. С., Мовсесян С. Г. Биологический журнал Армении, 28, 98, 1975.
21. Fritz P. J., White E. L., Prullit K. M., Vessell E. S. Nature New Biol., 230, 119, 1971.
22. Lindy S. J. Biol. Chem. 249, 4961, 1974.
23. Jamleson D., van den Brenk H. A. S. Nature, 20, 1227, 1964.
24. Березовский В. А., Индиченко И. С. Физiol. ж., 16, 795, 1970.