The activity of some enzymes as a marker of membrane injury upon the freezing of isolated mitochondria

N. IVANOV, N. NESTOROV*, YA. PROFIROV, L. TSONEV*, TS. TSVETKOV*, R. VOYNOVA

Institute of Animal Husbandry, Kostinbrod, Bulgaria
* Meat Technology Research Institute, Sofia, Bulgaria

An experiment was made using mitochondria isolated from the liver of male Wistar rats. The suspension of isolated mitochondria in 0,25 M sucrose was frozen at -10°C and kept at the mentioned temperature for 30 min. After thawing the mitochondria, the activity was studied of the enzymes firmly linked with the mitochondrial membrane, cytochrome oxidase, NADH-cytochrome-C-reductase and succinate-dehydrogenase, and also of the soluble matrix enzymes, malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase.

The freezing of isolated mitochondria leads to a reliable decrease in succinate dehydrogenase activity, without invoking any changes in cytochrome oxidase and NADH-cytochrome-C-reductase activities.

Further, it is observed in the supernatant, that the release by mitochondria of malate dehydrogenase is 6,8 times greater, and that of glutamate dehydrogenase, 4,4 times.

Die Aktivität einiger Enzyme als Merkmal für eine Beschädigung der Membrane beim Gefrieren von isolierten Mitochondrien

N. IWANOW, N. NESTOROW, J. PROFIROW, L. ZONEW, Z. ZWETKOW, R. WOINOWA Institut für Tierzucht, Kostinbrod, Bulgarien Institut für Fleischwirtschaft, Sofia, Bulgarien

Es wurde ein Versuch mit aus der Leber von weissen männlichen Ratten isolierten Mitochondrien rien durchgeführt. Die Suspension von isolierten Mitochondrien in 0,25 M Sacharose wurde bei einer Temperatur von -10°C eingefroren und bei dieser angegebenen Temperatur 30 Minnten lang stehengelassen. Nach dem Auftauen der Mitochondrien wurde die Aktivität der mit der Mitochondrienmembrene festgebundenen Zytochromoxydase, NADN Zytochrom-C-Reduktase und Sukzinatdehydrogenase, sowie auch der lösbaren Matrixenzyme Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase, untersucht. Das Gefrieren von isolierten Mitochondrien führt zu einer statistisch gesicherten Aktivitätsverminderung der Sukzinatdehydrogenase, ohne Veränderungen in der Aktivität der Zytochromoxydase und der NADN Zytochrom-C-Reduktase zu verursachen. Be wird eine 6.8 mal stärkere Malatdehydrogenase- und eine 4.4 mal stärkere Glutamatdehydrogenaseausscheidung von den Mitochondrien im Überstand beobachtet.

L'activité de certains enzymes à titre d'indice de la détérioration de la membrane lors de la congélation de mitochondries isolées

N. IVANOV, N. NESTOROV, J. PROFIROV, L. TSONEV, TS. TSVETKOV, R. VOYNOVA

Institut d'élevage, Kostinbrod, Bulgarie

*Institut de recherches sur la viande, Sofia, Bulgarie

On a fait des essais avec des mitochondries, isolées du foie de rats blancs mâles. On a congelé la suspension de mitochondries isolées dans 0,25 M saccharose à -10°C pendant 30 minutes. Après la décongélation des mitochondries on a étudié l'activité de la cytochrome-oxydase, de la NADH cytochrome C réductase et de la succinate-déhydrogénase, fortement liées à la membrane des mitochondries, ainsi que celle des enzymes solubles - la malate-déhydrogénase et la glutamate-déhydrogénase.

La congélation des mitochondries isolées a mené à une diminution signifiante de l'activité de la succinate-déhydrogénase sans provoquer des changements de l'activité de la cytochrome oxydase et de la NADH cytochrome C réductase.

Активность некоторых ферментов как показатель повреждения мембраны при замораживаний изолированных митохондрий

н. иванов, н. несторов*, я. профиров, л. цонев*, ц. цветков*, р. войнова

Институт животноводства, Костинброд, Болгария * Институт мясной промышленности, София, Болгария

Проведен эксперимент с митохондриями, изолированными из печени мужских индивидов белых крыс. Суспензию изолированных митохондрий в 0,25 М сахарозе замораживали при -100 с и хранили при указанной температуре в течение 30 мин. После размораживания митохондрий исследовали активность прочно связанных с мембраной митохондрий цитохромоксидавы, NADH -цитохромоксидавы, NADH -цитохромоксидавы и сукцинатдегидравы, а также растворимых матриксных ферментов — малагдегидразы и глутаматдегидразы.

Замораживание изолированных митохондрий приводит к достоверному понижению активности сукцинатдегидразы, не вызывая изменений в активности цитохромоксидазы и NADH -цитохром-Средуктазы.

В супернатанте наблюдается также большее освобождение митохондриями малатдегидравы — в 6,8 раза, и глутаматдегидразы — в 4,4 раза.

255 4.17

Die Aktivität einiger Enzyme als Zeichen für eine Beschädigung der Membran beim Gefrieren von isolierten Mitochondrien

N. IWANOW, N. NESTOROW, J. PROFIROW, L. ZONEW, Z. ZWETKOW, R. WOINOWA

Institut für Tierzucht, Kostinbrod, Bulgarien Institut für Fleischwirtschaft, Sofia, Bulgarien

Gegenwärtig ist die Meinung vertreten, dass das Mechanismus der Kryobeschädigung bei lebenden Zellen mit Störungen in der Membrandurchlässigkeit verbunden ist. Es ist festgestellt worden, dass die Biomembran und insbesondere diese der Lysosome und der Mitochondrien die Stärkste Empfindlichkeit gegen die beschädigenden Auswirkungen niedriger Temperaturen aufweisen /6; 11, 15/.

Einige Wissenschaftler betrachten die Kryobeschädigung der Mitochondrien als wichtigste Ursache für die Zerstörung der Zellen beim Gefrieren /5, 16/. Für das Mechanismus der Energietransformation in der Zelle ist eine hochgradige strukturelle Organisation der Mitechondrien notwendig. Eine Verletzung dieser Organisation wird als Hauptursache für die Verminderung des Sauerstoffverbrauches und der Atmungskontrolle beim Gefrieren und bei dem darauf folgenden Auftauen der Gewebe angenommen /15/. Die exydative Phosphorilierung, sewie auch die Oxydation verschiedener Substrate von Lebermitechendrien von Ratten, wird beim Gefrieren Stark verringert. Bei einer Zugabe von NAD, Zytochrom C und ATP wird jedech die Atmungsakti-Vität der Mitochondrien im wesentlichen wiederhergestellt /10/. Dies ist ein Beweis dafür, dass das Gefrieren zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran hinsichtlich dieser für die Atmung wichtigen Faktoren geführt hat. Es wird ausserdem auch ein Austritt der Glutamatdehydrogenase und der β-Hydroxibutiratdehydrogenase aus den Mitochondrien beim Gefrieren der Mitochondriensuspension /in 0,44 M Sacharose/ festgestellt /8, 9/. Die von 80frorenen Geweben isolierten Mitochondrien weisen eine Verminderung der Zytochromoxydasenaktivität auf /15/. Beim Einfrieren bei einer Temperatur von -25°C und nachfolgendem Auftauen von Mäuseleberschnitten wird die Sukzinat-Zytochrom-C-Reduktasenaktivität vermindert 13, 4/0

Aus diesen Ausführungen ist es ersichtlich, dass die Kryobeschädigung einerseits zu einer Veränderung der Aktivität von einigen mit der Membrane festgebundenen Enzymen und andererseits zu einem Austritt aus den Mitochondrien einiger lösbaren Matrixenzyme führt.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Aktivität der mit der Mitochondrienmembran festBebundenen Zytochromoxydase, NADH Zytochrom-C-Reduktase und Sukzinatdehydrogenase, sowie
auch der lösbaren Matrixenzyme Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase, beim Gefrierer
von isolierten Mitochondrien zu verfolgen und die Möglichkeit zur Anwendung dieser Enzyme
als Zeichen /Marker/ für die Kryobeschädigung der Mitochondrien zu erwägen.

Material und Methodik

Der Versuch wurde mit aus der Leber von weissen männlichen Ratten /Wistar/ mit einem LebendSewicht von 140-150 g isolierten Mitochondrien in einem Medium von 0,25 M Sacharose durchSeführt /16/. Nach dreifachem Auswaschen wurde der Niederschlag von Mitochondrien aus 1 g

Leber mit 1 ml 0,25 M Sacharose suspendiert. Die Suspension wurde in zwei Teilen in Plastikreagenzgläsern verteilt. Der eine Teil wurde bei einer Temperatur von 0-2°C aufbewahrt, während der andere Teil bei einer Temperatur von -10°C eingefroren wurde. Temperaturen von
-10°C, -15°C werden als eine kritische Temperatur angesehen. Das Gefrieren und die Aufbewahrung der Mitochondrien bei solchen Temperaturen bewirkte die stärkste Beschädigung der
Mitochondrien /8, 9/. Nach 30 Minuten wurden die gefrorenen Mitochondrien aufgetaut und bei
einer Temperatur von 0-2°C aufbewahrt. Die Untersuchung hinsichtlich der Aktivität beider
Proben erfolgte gewöhnlich nach 1,5-2 Stunden. Die Ausgangssuspension wurde im Verhältnis
1:10 mit einer Lösung von 0,25 M Sacharose vordünnt. Die Aktivität der Zytochromoxydase,
der Sukzinatdehydrogenase der NADH-Zytochrom-C-Reduktase und der NAD-abhängigen Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase wurde durch kinetische Methoden mit einem Registrierspektrofotometer "Spekord" bestimmt. Nach Zentrifugieren eines Teiles der Mitochondriensuspension während 10 Minuten bei 16 000 Umdrehungen (g) wurde die Aktivität im Überstand
bestimmt.

Die Aktivität der Zytochromoxydase, Sukzinatdehydrogenase und der NADH-Zytochrom-C-Reduktase wurde auf Grund der bei der Oxydation bzw. Reduktion von Zytochrom C bei 550 nm eingestretenen Veränderung in der optischen Dichte nach der in einer unserer früheren Arbeiten bestimmten Methode untersucht /1/.

Die Aktivität der Malatdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase wurde auf Grund der bei der Oxydation von NADH bei 340 nm eingetretenen Veränderung in der optischen Dichte bestimmt /2/.

Die Proteine wurden nach der Methode von Lowry und Mitarb. bestimmt /7/.

Alle Daten wurden mathematisch nach der Dispersionsanalyse bearbeitet /F-Kriterium/e Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass das Einfrieren der Mitochondrien bei einer Temperatur von -10°C und das danach folgende Auftauen bis zu einer 2-fachen Zunahme der Proteine im Überstand führen /Tab. 1/.

Es wird keine bedeutende Veränderung der Aktivität der Zytochromoxydase und der NADH-Zytochrom-C-Reduktase in der Mitochondriensuspension, in mg Proteine ausgedrückt, beobachtet /Tab. 2/. Einige Autoren stellen jedoch eine verminderte Aktivität der Zytochromoxydase in von gefrorenen Nierenschnitten isolierten Mitochondrien fest /15/. Der Grund für diese Unterschiede liegt wahrscheinlich in der verschiedenen Aufstellung der Untersuchungen. Dagegen nimmt aber die Aktivität der Sukzinatdehydrogenase deutlich ab. Ähnliche Ergebnisse werden auch bei der Gefrierung von Mäuseleberschnitten erhalten /3, 4/. Im Überstand nimmt die Aktivität der NADH-Zytochrom-C-Reduktase ab, jedoch ist diese Abnahme eine nur relative Abnahme und ist faktisch auf einen Übergang im Überstand von zweimal mehr Proteinen, aber nicht auch von Molekülen der NADH-Zytochrom-C-Reduktase, beim Gefrieren der Mitochondrien zurückzuführen. Von der Gesamtaktivität dieses Enzymes sind bei den nichtgefrorenen Mitochondrien nur 10,5% und bei den gefrorenen 12% enthalten /Tab. 3/. Im Überstand der gefrorenen Mitochondrien wird auch eine Zunahme der Zytochromoxydasemaktivität beobachtet, aber diese ist unbedeutend im Vergleich zur Gesamtaktivität. Eine Aktivität der Sukzinatdehydrogenase wird im Überstand nicht festgestellt.

Die Aktivität der Matrixenzyme - der NAD-abhängigen Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase - nimmt statistisch gesichert sowie in der Mitochondriensuspension, als auch im Überstand, zu /Tab. 4/. Bei der Malatdehydrogenase wird im Überstand eine nahezu 4,5-fache und bei der Glutamatdehydrogenase eine 3,5-fache Zunahme festgestellt. Ein verstärkter Austritt

von Glutamatdehydrogenase im Überstand wurde auch von anderen Autoren beobachtet /8, 9/.

In Anbetracht dessen, dass sich die Proteine im Überstand nur zweimal vermehren, wird es deutlich, dass die erhöhte Aktivität dieser Enzyme auf den Übergang ihrer Moleküle aus den Mitochondrien im Überstand zurückzuführen ist. Bei den Kontrollmitochondrien kommen der Supernatante 0,86% der Gesamtaktivität der Molatdehydrogenase und 0,71% der Glutamatdehydrogenase zu /Tab. 5/. Das Gefrieren hat bis zu einer 6,8- bzw. 4,4-fachen Erhöhung des Prozent satzes der Aktivität dieser Enzyme im Überstand geführt. Die latente Aktivität, d.h. die sich nach mehrfachem Gefrieren und Auftauen der Mitochondrien vermindernde Aktivität, sinkt nach einem Gefrieren bei einer Temperatur von -10°C von 39,3% auf 15,5% bei der Malatdehydrogenase und von 75,3% auf 48,5% bei der Glutamatdehydrogenase.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass das Gefrieren von Mitochondrien zu einer Verminderung der Aktivität der Sukzinatdehydrogenase - eines mit den Mitochondrienenzymen festgebundenen Enzymes - führt. Nach einigen Autoren ist dies auf die beschädigende Auswirkung der Kristallisation des Wassers zurückzuführen, da vor dem Zeitpunkt der Kristallisation keine niedrigere Aktivität zu beobachten ist. Dieselben Autoren sind aber der Meinung, dass der Zeitpunkt der Eisbildung nicht der entscheidenste Faktor ist und dass die verminderte Aktivität auch mit anderen Faktoren verbunden ist, wie z.B. mit der Dehydratation und der Ronzentration von Elektrolyten /3, 4/. Die Aktivitätzunahme der Matrixenzyme Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase kann mit der Beschädigung der Mitochondrienmembrane und somit mit einem erhöhten Zutritt des Substrates zu ihnen erklärt werden. Grund zu dieser Annahme ist die verminderte latente Aktivität dieser Enzyme. Die Beschädigung der Mitochondrienmembrane hat ausserdem auch zu einem erheblichen Austritt dieser Enzyme im Überstand geführt. Somit kann die Aktivität dieser beiden Enzyme im Überstand als Zeichen für eine Beschädigung der Mitochondrienmembrane sein. In erheblichem Masse kann zu diesem Zweck auch die Verminderung der in der Mitochondriensuspension gemessenen Aktivität der Sukzinatdehydrogenase angewendet werden.

Schlussfolgerung

Das Gefrieren von isolierten Mitochondrien von Rattenleber in einem Medium von 0,25 M Sacharose bei einer Temperatur von -10°C während 30 Minuten führt zu einer statistisch gesicherten Aktivitätverminderung der Sukzinatdehydrogenase ohne Veränderungen in der Aktivität der Zytochromoxydase und der NADH-Zytochrom-C-Reduktase zu verursachen.

Es wird auch ein 6,8 mal stärkerer Malatdehydrogenase- und 4,4 mal stärkerer Glutamatdehydrogenaseaustritt aus den Mitochondrien im Überstand beobachtet.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass das Einwirken niedriger Temperaturen zu einer Beschädigung der Mitochondrienmembrane geführt hat, welches aus der Verminderung der Aktivität der Sukzinatdehydrogenase in den Mitochondrien und der Zunahme der Aktivität der Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase im Überstand zu erschliessen ist.

Tab. 1 Prozentsatz der Proteine im Überstand und im Mitochondrienniederschlag nach Zentrifugieren der Mitochondriensuspension

Tab. 1 Percent distribution of protein between supernatant and mitochondrial sediment after centrifugation of the mitochondrial suspension

Gruppen (groups)	Überstand (supernatant)	Niederschlag (Sediment)
Kontrolle	14	86
\ -10°0	28 +++	72

⁺⁺⁺ P < 0,001

Tab. 2 Aktivität der Zytochromoxydase, der Sukzinatdehydrogenase und der NADH-Zytochrom-C-Reduktase in nmol/min/mg Proteine

Tab. 2 Activity of cytochromoxydase, succinatdehydrogenase and NADHcytochrom-C-reductase in nmol/min/mg protein

Art des untersuchten Materials	Zytochromoxydase		Sukzinatdehydro- genase		NADH-Zytochrom-C- Reduktase	
(Type of invomaterial)	Kontrolle (control)	Versuch (test)	Kontrolle (control)	Versuch (test)	Kontrolle (control)	Versuch (test)
Mitochondriensuspension (mitochondrial suspension)	359	331	73.9	54.7***		
Überstand			7207	2407	136	132
(Supernatant)	6.1	5.1	-	-	38.3	21.8***

+++ P < 0,001

Tab. 3 Prozentsatz der Aktivitäten der Zytochromoxydase, der Sukzinatdehydrogenase und der NADH-Zytochrom-C-Reduktase nach Zentrifugieren der Mitochondriensuspension

Tab. 3 Percent distribution of Cytochromoxydase, succinatdehydrogenase and NADHcytochrom-C-reductase activity, fallowing centrifugation of the mitochondrial

Untersuchte Enzyme (inv. enzymes)	Über (sur	Niederschlag (sediment)		
Zytochromoxydase	Kontrolle	0.67		
Sukzinatdehydrogenase	- 10°C Kontrolle	1.57		99°3 98°4 100
NADH-Zytochrom-C- Reduktase	- 100C Kontrolle - 100C	10.5 12.0	0	100 89•5 88•0

Tab. 4 Aktivität der Malatdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase in nmol/min/mg Proteine Tab. 4 Activity of malatdehydrogenase and glutamatdehydrogenase in nmol/min/mg protein

Untersuchte Enzyme (inv. enzymes)	Gruppen (groups)	Mitochondrien- suspension (mitochondrial suspension)	Überstand (supernatant)	
Malatdehydrogenase	Kontrolle	703 862***	112 511***	
Glutamatdehydrogenase	Kontrolle - 10°C	296 487 ⁺⁺⁺	123 433***	

Tab. 5 Prozentsatz der Aktivitäten der Malatdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase nach Zentrifugieren der Mitochondriensuspension

Tab. 5 Percent distribution of malatdehydrogenase and glutamatdehydrogenase activity following centrifugation of the mitochondrial suspension

Untersuchte Enzyme	Gruppen	Uberstand	Niederschlag	Latente Aktivität (latent activity)
(inv. enzymes)	(groups)	(supernatant)	(sediment)	
Malatdehydrogenase	Kontrolle	0.86 6.81***	59.8 77.7	39°3 15°5
Glutamatdehydro-	Kontrolle - 10°C	0.71	24.0	75°3
genase		4.39***	47.1	48°5

* Latente Aktivität - die sich nach dreifachem Gefrieren und Auftauen der Mitochondrien bei -1500 vermindernde Aktivität

Latent activity - which decreases following threefold freezing and thawing of mitochondria at -1500

+++P < 0,001

LITERATUR:

- 1. Iwanew N., J. Prefirow, Ziwotnowadni nauki, 1976, 7, 71
- 2. Prefirow J., N. Iwanew, Ziwetnowadni nauki, 1978, unter Druck
- 3. Fishbein W.N., R.E. Stewell, Cryebiology, 1968, 4, 285
- 4. Fishbein W.W., Cryobielogy, 1971, 8, 293
- 5. Heber U., Plant Physicl., 1967, 42, 1349
- 6. Love R.M., Cryobiology, Acad. Press, N.Y. 1966, 398
- 7. Lowry O.H., N.J. Rosenbrouch, A.R. Farr, R.J. Randal, J. Biol. Chem., 1951, 193
- 8. Lusena E.V., Canad. J. Biochem., 1965, 43, 1787
- 9. Lusena C.V., E.M. Dass, Canad. J. Biochem., 1966, 44, 775
- 10. Porter U.S., N.P. Denning, R.S. Wright, E.M. Scott, J. Biel. Chem., 1953, 205, 883
- 11. Sherman J.K., Cryobiology, 1967, 3, 407
- 12. Sherman J.K., Cryobiology, 1967, 4, 137
- 13. Sherman J.K., Cryobiology, 1969, 3, 98
- 14. Sherman J.K., Cryobiology, 1978, 6, 581
- 15. Sherman J.K., J. Cell., Comp., Physiol., 1964, 61, 154
- 16. Shneider W.G., G.H. Hegeboem, J. Biol. Chem., 1950, 183, 123