

Т. Н. ИВАНОВА, Л. Н. РУБЕЛЬ

ПИРИДИННУКЛЕОТИДЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПЕРОКСИИ

(Представлено академиком Е. М. Кренсом 7 IV 1970)

Система пиридиннуклеотидов (НАД и НАДФ) является одним из основных акцепторов водорода при окислении многих субстратов в клетке. В связи с этим всякие воздействия на организм животного, приводящие к изменению окисленных и восстановленных форм этой системы, приводят к сдвигам метаболизма клеток, а следовательно, и к изменению их функционального состояния.

Существует тесная взаимосвязь между скоростью потока электронов, окислительно-восстановительным состоянием НАД/НАД-Н и интенсивностью синтеза АТФ (¹). При недостатке кислорода НАД переходит в восстановленную форму (НАД-Н), ток электронов замедляется и падает интенсивность синтеза АТФ. Показано значительное повышение количества НАД-Н + НАДФ-Н в почках и коре мозга при помещении животных в среду, обедненную кислородом (до 8% O₂), в среду чистого N₂, после введения сульфидов и цианидов (²). При кратковременной гипоксии в мозгу, печени и почках крыс, наряду со значительным снижением окисленных форм НАД и НАДФ, наблюдалось и снижение активности дегидрогеназ цикла Кребса (³).

Естественно было предположить, что в атмосфере чистого кислорода, а особенно при повышенном его давлении (гипероксии), соотношения могли быть обратными.

В опытах *in vivo* на крысах, при использовании специфического микрофлуорометрического метода Б. Чанс и сотрудники (⁴) показали, что помещение животных в 100% O₂ и быстрое повышение давления до 10 ата приводит к значительному сдвигу соотношения НАД/НАД-Н в мозгу, печени и почках в сторону накопления окисленных форм. На основании этих данных авторы делают заключение, что первичным эффектом гипероксии на ткани является торможение связанного с использованием энергии пути восстановления НАД. Однако указанный метод (⁴) дает возможность получать лишь относительные данные об увеличении или убыли восстановленной формы нуклеотидов. Кроме того, в этих условиях определяются суммарно ди- и трифосфопиридиннуклеотиды (НАД + НАДФ), в то время как восстановление их идет за счет различных метаболических реакций, интенсивность которых в условиях гипероксии может быть весьма различной.

Общезвестно, что пребывание животных в атмосфере 100% O₂ при повышенном давлении (начиная с 4—5 ата) вызывает судороги, близкие к судорогам, наблюдаемым при эпилептическом припадке. Есть указания (⁵), что именно мозговая ткань наиболее чувствительна к воздействию гипероксии.

В связи с этим, а также для выяснения первичных механизмов действия гипероксии на организм животных представлялось интересным провести количественный учет содержания всех четырех форм пиридиннуклеотидов (НАД, НАД-Н, НАДФ и НАДФ-Н) в ткани мозга крыс при различных сроках воздействия гипероксии в 1 и 7 ата.

Учитывая тесную связь метаболизма пиридиннуклеотидов с синтезом АТФ, у этих же животных проводили определение в ткани мозга запасов макроэргов — фосфокреатина (ФК) и адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ).

Опыты ставили на крысах линии Вистар весом 180—220 г. Животных забивали погружением в жидкий кислород. Опыты с повышенным давлением кислорода проводили в специальной камере, позволяющей убивать животных в жидком кислороде без предварительной декомпрессии (6). Последний факт имеет особое значение при анализе таких лабильных соединений, как пиридиннуклеотиды, ФК и АТФ, количество которых могло изменяться за время декомпрессии.

Окисленные и восстановленные формы пиридиннуклеотидов определяли высокочувствительным ферментативным методом по Слейтеру и др. (7) с модификациями, относящимися к методике получения экстрактов ткани. Для определения НАД и НАД-Н использовали препараты алкогольдегидрогеназы (КФ.1.1.1.1.) фирмы Реанал, Венгрия, а для определения НАДФ и НАДФ-Н — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ.1.1.1.49) фирмы Флука и Бухе (Швейцария). ФК определяли по Эйнору и Розенбергу (8), адениловые нуклеотиды хроматографически — разделением на микроколонках из эктеола-целлюлозы по (9). Фотометрические определения проводили на спектрофотометре СФ-4А.

Из замороженной головы быстро извлекали большие полушария мозга и растирали с жидким O_2 до тонкого порошка. Для определения окисленных форм пиридиннуклеотидов (НАД и НАДФ), ФК и адениловых нуклеотидов готовили кислый экстракт из 400—500 мг ткани на 10% трихлоруксусной (ТХУ) кислоте в 0,005 М ЭДТА. Вторая навеска (400—500 мг) служила для приготовления щелочного экстракта, в котором определяли восстановленные формы — НАД-Н и НАДФ-Н. Экстракт готовили по Клингенбергу (9) на 0,5 N КОН в 50% спирту с последующей нейтрализацией 1 M раствором яблочной кислоты. Конечные соотношения ткани и растворителя 1 : 10.

Учитывая указания (10) о значительной чувствительности НАДФ к воздействию крепких кислот, мы поставили контрольные опыты с экстракцией ткани мозга 0,02 N H_2SO_4 на 0,1 M Na_2SO_4 . Заметных различий по сравнению с экстракцией 10% ТХУ получено не было.

Результаты трех серий опытов представлены в табл. 1 и 2.

Как следует из приведенных данных, в больших полушариях мозга крыс в норме НАД находится большей частью в окисленной форме

Таблица 1

Содержание НАД, НАД-Н и НАДФ-Н в ткани мозга крыс в норме и при воздействии гипероксии в 1 и 7 ата (μмол. на 1 кг свежей ткани)

№ оп.	Контроль				№ оп.	Гипероксия 7 ата				№ оп.	Гипероксия 1 ата			
	НАД	НАД-Н	НАД/НАД-Н	НАДФ-Н		НАД	НАД-Н	НАД/НАД-Н	НАДФ-Н		НАД	НАД-Н	НАД/НАД-Н	НАДФ-Н
1	237	62	5,27	60	11	408	47	8,70	35	19	477	56	8,5	53
2	336	53	6,34	59	12	368	55	6,87	36	20	420	55	7,7	54
3	297	53	5,21	66	13	362	27	13,50	34	21	455	38	11,8	55
4	306	47	6,50	70	14	389	42	9,20	63	22	380	38	10,0	56
5	340	50	5,70	65	15	409	50	8,40	61	23	375	42	8,8	57
6	345	64	5,40	46	16	457	63	7,20	44	24	391	57	6,8	58
7	345	63	5,50	60	17	525	62	8,46	59	М	411	53	8,0	59
8	358	68	5,17	63	18	404	44	9,20	59	в	+21,0	+4,0	+0,56	60
9	338	68	5,76	63	М	425	50	8,90	49	р	△0,01	△0,5	△0,001	61
10	338	70	5,03	56	т	+19,0	+4,5	+0,80	+4,5					62
11	338	64	5,60	61	у	△0,001	△0,05	△0,001	△0,05					63
12	+8,3	+2,0	+0,40	+1,3										64

Примечание. В опытах №№ 12—16 — животных убивали через 22—32 мин., в момент 1-го судорожного приступа; опыт № 11 — на 37 мин., без выраженных судорог; опыты №№ 17, 18 через 5—13 мин. без судорог. Длительность гипероксии 1 ата 30 мин.

Таблица 2

Содержание фосфокреатина и адениловых нуклеотидов в больших полушариях мозга крыс в норме и при гипероксии в 7 ата ($\mu\text{мол/г}$, $M \pm m$) *

Условия опыта	ФК	АТФ	АДФ	АМФ	АТФ/АДФ
Контроль (на воздухе)	3,18 (10) \pm 0,085	2,17 (10) \pm 0,009	0,34 (10) \pm 0,006	0,26 (10) \pm 0,05	6,64 \pm 0,397
Гипероксия 7 ата (5-30 мин)	3,76 (8) \pm 0,108 $P < 0,001$	2,23 (8) \pm 0,037 $P > 0,5$	0,32 (8) \pm 0,005 $P > 0,02$	0,25 (8) \pm 0,015 $P > 0,5$	7,10 \pm 0,35 $P < 0,5$

* В скобках — число опытов.

(339 $\mu\text{мол/кг}$) и значительно меньшая его часть в восстановленной (61 $\mu\text{мол/кг}$). Отношение НАД / НАД-Н = 5,6. В противоположность этому НАДФ в основном открывается в восстановленной форме — НАДФ-Н (61 $\mu\text{мол/кг}$), тогда как окисленной формы определены лишь следы. При воздействии гипероксии (1 ата 30 мин. и 7 ата от 5 до 37 мин.) установлено значительное, на 20%, увеличение количества окисленной формы НАД при соответствующем снижении восстановленной формы. При этом отношение НАД / НАД-Н возрастает с 5,6 до 8,9. Однако ни в одном из опытов в условиях гипероксии нами не было определено заметных количеств окисленного НАДФ, хотя количество НАДФ-Н в этих условиях было понижено. Все указанные изменения были более выражены в опытах с воздействием гипероксии в 7 ата.

Макроэрги ткани мозга (ФК и АТФ, см. табл. 2) во всех опытах с гипероксией имели тенденцию к повышению, а количество ФК достоверно возрастало. Эти данные хорошо согласуются с результатами нашей предыдущей работы (6), где количества макроэргов мозга определялись в различные этапы формирования гипероксических судорог.

Установленные нами факты увеличения окисленной формы НАД в мозгу крыс при воздействии гипероксии разной степени (от 1 до 7 ата) и длительности (от 5 до 40 мин.) можно рассматривать, как первичные изменения в цепи метаболических реакций, вовлекаемых в механизм токсического действия гипероксии. Наступившее в клетках мозга новое окислительно-восстановительное состояние (характерное для гипероксических условий) определяет дальнейшие количественные и качественные сдвиги обменных процессов мозга.

Данные настоящей работы, а также многочисленные исследования других авторов о метаболических сдвигах в мозгу при воздействии гипероксии (11), пока не позволяют дать определенный ответ на вопрос о непосредственных причинах возникновения гипероксических судорог.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академия наук СССР
Ленинград

Поступило
30 III 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. Chance, J. Gen. Physiol., 49, 163 (1965). ² B. Chance, P. Cohen et al., Science, 137, 499 (1962). ³ Н. Д. Ещенко, Л. М. Крестникова и др., Второй Всесоюзный биохимич. съезд. Тез. докл. на симпозиуме, Ташкент, 1969, стр. 99. ⁴ B. Chance, D. Jamieson, H. Coles, Nature, 206, 257 (1965). ⁵ F. Dickens, In: Neurochemistry, Illinois, 1962, p. 851. ⁶ Т. Н. Иванова, Л. Н. Рубель, Журн. эволюцион. биохим. и физиол., 5, 279 (1969). ⁷ T. F. Slater, B. Sawyer, U. Strauli, Arch. Intern. Physiol. Biochem., 72, 427 (1964). ⁸ A. H. Ennor, H. Rosenberg, Biochem. J., 51, 606 (1952). ⁹ M. Klingenberg, In: Methods of Enzymatic Analysis, N. Y., 1965, p. 531. ¹⁰ H. B. Burch, O. H. Lowry, P. Van Dipp, J. Biol. Chem., 238, 2838 (1963). ¹¹ N. Haugaard, Physiol. Rev., 48, 312 (1968).