

К. Ф. ШОЛЫЦ, Р. Г. БАБАДЖАНОВА

ДЕЙСТВИЕ ДИЭТИЛОВОГО ЭФИРА НА СООТНОШЕНИЕ
АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ
ПЕЧЕНИ КРЫС *IN VIVO*

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 IX 1970)

Ранее было установлено, что диэтиловый эфир вызывает резкий подъем уровня цитрата и увеличение соотношения лактат/пируват в печени голодающих крыс (^{1, 2}). У сытых животных увеличения уровня цитрата в печени не происходит. Полученные данные объясняются различной активностью пируваткарбоксилазы в сытом и голодном состоянии животных. Митохондриальные ферменты пируваткарбоксилаза и цитратсинтаза, ответственные за продукцию цитрата в печени, подвергаются регулируемому влиянию адениновых мононуклеотидов (^{3, 4}). В связи с этим представляло интерес выявить характер возможных изменений в соотношении адениновых нуклеотидов в митохондриях при указанных воздействиях.

В настоящей работе приведены данные по хроматографическому анализу нуклеотидов митохондрий печени крыс при поверхностном наркозе диэтиловым эфиром у голодающих животных.

Работа проводилась на самцах белых крыс, весом 250—280 г, голодавших в течение суток. Условия наркоза описаны ранее (^{1, 2}). Выделение митохондрий и определение нуклеотидов проводилось по описанным ранее методикам, за исключением стадии выделения нуклеотидов из митохондрий.

Методика выделения нуклеотидов заключается в следующем: суспензию митохондрий (1—2 мл), содержащую 15—20 мг белка в 1 мл, центрифугируют при 0—+2° в пробирке на 10 мл при 5600 g (время центрифугирования с момента включения до момента полной остановки вращения не более 3 мин.). Надосадочная жидкость тщательно удаляется, и к осадку добавляют при перемешивании 0,2 мл 2 M соляной кислоты. Через 15 мин. после начала экстракции проводят центрифугирование, как описано выше. На колонку с сефадексом Г-10 диаметром 5 мм и высотой 450 мм наносится 0,15 мл надосадочной жидкости. Наполнение колонки и элюция (25 мл/час) проводится бидистиллированной водой. Первые 2 мл после контроля на поглощение (при 260 мμ) отбрасываются. Собирается последующая фракция, содержащая 90—93% нуклеотидов (по поглощению). Третью фракцию (соляная кислота) собирают с момента увеличения электропроводности, которую измеряли в проточной микрокувете. В модельных опытах было установлено, что вторая фракция содержит 70% АМФ, 90% АДФ и 95—97% АТФ, НАД, НАД-Н, НАДФ, НАДФ-Н от посаженного. Эти величины в определенных пределах постоянны и используются в качестве поправок к результатам анализа.

Работа проводилась на митохондриях с дыхательным контролем по Чансу на сукцинате с ротепоном в пределах от 3 до 5 (определение амперометрическое на ячейке с закрытыми электродами (⁵)). Белок определяли по Лоури (⁶).

В настоящей работе было установлено, что соотношение НАД-Н/НАД⁺ в митохондриях не изменяется (табл. 1). Поскольку в цитоплазме отно-

шение НАД-Н/НАД⁺ растет (¹), это означает, что при эфирном наркозе не эффективна система шунтирования, которая обычно обеспечивает параллелизм в изменениях этих соотношений по обе стороны митохондриальной мембраны (⁷). Также не было получено изменений в соотношении НАДФ-Н/НАДФ⁺. Не было обнаружено достоверных изменений в содержании АМФ и суммы АТФ + АДФ + АМФ.

Как видно из приведенной таблицы, при эфирном наркозе имеет место увеличение соотношения АТФ/АДФ в митохондриях, хотя, как было

Таблица 1

Изменение соотношения адениновых нуклеотидов в митохондриях печени крыс, голодавших 24 часа, при воздействии диэтиловым эфиром, нмол. на 1 мг белка

Показатель	Контроль (6 опытов)	Наркоз (7 опытов)	Степень изменения	P
НАД	1,43±0,12	1,41±0,10	—	—
НАД-Н	1,20±0,19	1,25±0,18	—	—
АТФ	2,16±0,24	3,10±0,31	1,44	<0,05
АДФ	5,52±0,33	4,38±0,33	1,26	<0,05
АМФ	2,75±0,90	2,29±0,35	—	—
НАДФ	0,21±0,09	0,24±0,08	—	—
НАДФ-Н	3,55±0,45	3,39±0,28	—	—
АТФ/АДФ	0,393±0,042	0,714±0,050	1,81	<0,01
НАД-Н/НАД ⁺	0,864±0,140	0,933±0,189	—	—
НАДФ-Н/НАДФ ⁺	16,9	14,9	—	—
АТФ+АДФ+АМФ	10,42±1,32	9,74±0,73	—	—

показано (⁸), при поверхностном эфирном наркозе это соотношение в целой печени не изменяется. Поскольку митохондриальные адениновые мононуклеотиды составляют около 20% от общего содержания их в печени, изменение соотношения АТФ/АДФ в митохондриях не должно было существенно отразиться на этом соотношении в целой ткани. Полученные результаты не противоречат данным о том, что диэтиловый эфир *in vitro* вызывает разобщение окислительного фосфорилирования (^{9, 10}). Как было показано Клингенбергом и сотрудниками (¹¹), интактные митохондрии *in vitro* сохраняют более низкое соотношение АТФ/АДФ, чем в окружающей среде, однако при действии разобщителей это соотношение в митохондриях возрастает, что связано с особенностями транслокации нуклеотидов митохондриями. В нашем случае, видимо, происходит аналогичное изменение *in vivo*. Хотя диэтиловый эфир нельзя отнести к типичным разобщителям типа 2,4-ДНФ (¹²), поскольку его молекула не несет заряда, однако его действие может быть связано с обратимым нарушением митохондриальной мембраны, благодаря его липофильным свойствам. Это нарушение может отразиться на работе локализованной в митохондриях транслоказы Клингенберга.

Увеличение отношения АТФ/АДФ способствует активации пируваткарбоксилазы (³). По данным (⁴), увеличение числа макроэргичных связей в адениновых мононуклеотидах должно подавлять активность цитратсинтазы. В данном случае расчеты показывают, что в условиях наркоза диэтиловым эфиром происходит такое увеличение макроэргичности, которое изменяет активность этого фермента не более чем на 2—3%.

Таким образом, полученные результаты согласуются с высказанным ранее предположением (²) об активации в условиях эфирного наркоза синтеза цитрата из пирувата.

- ¹ К. Ф. Шольц, М. И. Николаева-Ромберг, Сборн. Митохондрии. Биохимические функции в системе клеточных органелл, «Наука», 1969, стр. 33.
- ² К. Ф. Шольц, Доклад на VI Всесоюз. митохондриальн. конфер., М., 1970.
- ³ P. Walter, J. M. Stucki, *Europ. J. Biochem.*, **12**, 508 (1970).
- ⁴ P. B. Garland, In: *The Metabolic Roles of Citrate*, 1968, p. 41.
- ⁵ К. Ф. Шольц, Д. Н. Островский, *Лаб. дело*, № 8, 375 (1965).
- ⁶ O. H. Lowry, *Methods in Enzymol.*, **3**, 448 (1957).
- ⁷ G. D. Greville, In: *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, Amsterdam, 1966, p. 86.
- ⁸ H. Reinauer, S. Hollmann, *Der Anaesthesist*, **15**, 327 (1966).
- ⁹ И. Н. Баркан, Кандидатская диссертация, М., 1966.
- ¹⁰ R. N. Miller, F. E. Hunter, *Federat. Proc.*, **28**, 355 (1969).
- ¹¹ M. Klingenberg, R. Wulf et al., *FEBS Symp.*, **17**, 59 (1969).
- ¹² В. П. Скулачев, *Аккумуляция энергии в клетке*, «Наука», 1969, стр. 143.