

В. Н. КАРНАУХОВ, В. Г. БРАЙЛОВСКАЯ, Л. Г. ХАСПЕКОВ,
В. П. ЗИНЧЕНКО, Л. Д. ЛУКЬЯНОВА

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС IN SITU

(Представлено академиком Г. М. Франком 15 I 1971)

Как известно, такие важнейшие компоненты энергетических систем клетки, как пиридиннуклеотиды и флавопротеины, обладают собственной люминесценцией. Пиридиннуклеотиды люминесцируют в интервале 460—480 мμ только в восстановленном состоянии (¹), в то время как флавопротеины обладают люминесценцией при 520—530 мμ только в окисленном состоянии (^{2, 3}). Таким образом, благодаря тесной взаимосвязи между функциональной активностью клеток и соотношением окисленных и восстановленных форм пиридиннуклеотидов и флавопротеинов систем терминального окисления (^{4, 5}) возможно следить за функциональной активностью клеток и тканей по их спектрам люминесценции. Наиболее существенным преимуществом техники люминесцентного анализа при этом является возможность изучать отдельные клетки (⁶) или ткани (⁷), не выделяя их из организма подопытного животного.

Однако применение этих методов люминесцентных исследований клеток и тканей in situ ограничено широко распространенным мнением, что значительное поглощение люминесцентного излучения присутствующим в ткани гемоглобином крови сильно искажает реальные характеристики объекта. Эти опасения, действительно, справедливы в том случае, если используется техника микрофлюориметрического анализа, позволяющая производить измерения в одной или двух длинах волн. В этом случае изучаются, в основном, освобожденные от крови, перфузируемые органы (⁸). В случае же применения техники микроспектрофлюориметрического анализа присутствие гемоглобина крови не только не препятствует определению окислительно-восстановительного состояния ткани in situ, но и позволяет получить дополнительно ценные экспериментальные данные.

Исследования проводились на ткани коры головного мозга крыс in situ с помощью модифицированного (⁶) микроспектрофлюориметра (⁹), предметный столик которого был заменен платформой для закрепления животного. Операция по удалению части кожи и кости черепной коробки производилась под общим наркозом, с применением искусственного дыхания. Проведение этой операции возможно также и при местном анестезировании.

Люминесцентные спектральные исследования клеток проводились без применения контактных объектов, с целью избежания механического раздражения нервной ткани. Размеры исследуемого участка 20×100 μ, глубина фокусировки 200—300 μ. Для возбуждения люминесценции использовалась линия излучения 365 мμ дуговой ртутной лампы ДРШ-250, выделяемая светофильтром УФС-6. Регистрируемый in situ спектр люминесценции участка нервной ткани приведен на рис. 1, 1. Этот спектр отличается от спектра люминесценции среза коры головного мозга крысы (¹⁰) двумя особенностями, связанными с присутствием гемоглобина крови. Пульсации мозга под действием кровотока приводят к появлению периодических импульсов на кривой спектра люминесценции нервной ткани, составляющих 2—5% от интенсивности люминесценции. Такие пульсации не только не

мешают анализу спектра люминесценции, но и позволяют постоянно контролировать в процессе эксперимента количество крови, циркулирующей через изучаемый участок ткани. Второй особенностью этого спектра является наложение полос поглощения гемоглобина на спектр люминесценции ткани. Поскольку спектры поглощения гемоглобина крови как в окисленном (рис. 1, 3), так и в восстановленном (рис. 1, 4) состояниях хорошо известны (^{11, 12}), это наложение

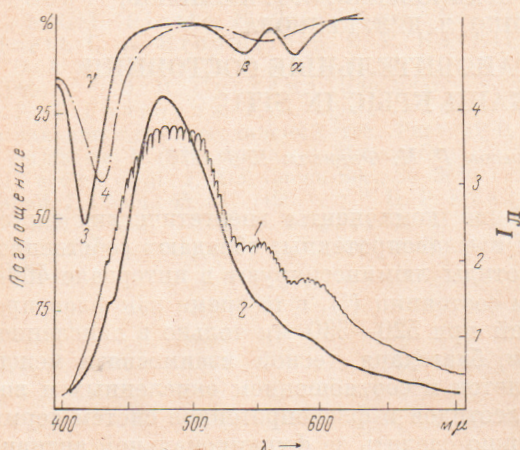


Рис. 1. Спектр люминесценции участка коры головного мозга живой крысы (1) и того же участка после гибели животного (2). Спектр поглощения окисленного гемоглобина (3) и восстановленного гемоглобина (4)

вая γ -полоса поглощения окисленного гемоглобина оказывает малое влияние на спектр люминесценции ткани (рис. 1, 1), а сам этот спектр имеет характерную форму с примерно одинаковой интенсивностью как в области восстановленных пиридиннуклеотидов (460—480 м μ), так и в области окисленных флавопротеинов (520—530 м μ).

Остановка кровообращения при гибели животного приводит к тому, что прекращаются пульсации интенсивности на кривой спектра люминесценции (рис. 1, 2), исчезают минимумы 580 и 540 м μ , что свидетельствует о переходе гемоглобина в изучаемом участке ткани в восстановленное состояние. Этот переход сопровождается заменой α - и β -полос в спектре поглощения гемоглобина на одну более широкую полосу с максимумом 560 м μ (рис. 1, 3, 4). О том же свидетельствует и сужение спектра люминесценции (рис. 1, 2) в области длин волн 430—450 м μ ; так как это сужение обусловлено поглощением люминесценции γ -полосой восстановленного гемоглобина, смешивающейся при этом к 430 м μ .

Прекращение кровоснабжения и восстановление гемоглобина крови приводит к развитию тканевой гипоксии исследуемого участка нервной ткани, что сопровождается увеличением интенсивности люминесценции восстановленных пиридиннуклеотидов в области 470 м μ и уменьшением интенсивности люминесценции окисленных флавопротеинов при 520 м μ (рис. 1, 2).

Сравнение приведенных выше спектров люминесценции нервной ткани *in situ* со спектрами срезов коры головного мозга крыс (¹⁰) показывает, что в изолированных срезах коры головного мозга происходит нормализация энергоаппарата ткани только после 1—1,5 часов инкубации свежеприготовленных срезов в физиологическом растворе.

- ¹ O. Warburg, Wasserstoff übertragende Fermente, Saenger, Berlin, 1948, p. 21.
- ² B. Chance, B. Schoener, In: Flavins and Flavoproteins, Amsterdam — N. Y.— London, 1966, p. 510.
- ³ В. П. Зинченко, В. Н. Щипакин, В. Н. Карнаухов, В сборн. Митохондрия, «Наука», 1970.
- ⁴ B. Chance, G. R. Williams, Adv. in Enzymol., **17**, 65 (1956).
- ⁵ V. N. Karnaukhov, V. K. Pavlenko, Studia Biophys., **23**, 69 (1970).
- ⁶ В. Н. Карнаухов, В. П. Зинченко, Цитология, **13**, 1243 (1974).
- ⁷ B. Chance, V. Legallais, B. Schoener, Nature, **195**, 1073 (1962).
- ⁸ R. Scholz, R. G. Thurman et al., J. Biol. Chem., **244**, 2317 (1969).
- ⁹ В. Н. Карнаухов, В. И. Кулаков и др., Цитология, **10**, 654 (1968).
- ¹⁰ Л. Д. Лукьянова, Л. Г. Хаспекон и др., В сборн. Митохондрия, «Наука», 1970.
- ¹¹ B. Thorrell, In: Porphyrin Biosynthesis and Metabolism, London, 1955, p. 174.
- ¹² J. J. Wolkow, In: Hemorheology, Proc. 1 Intern. Conf. Univ. Iceland, Reykjavik, Oxford, 1967, p. 525.