

УДК 612.273.1:577.3

ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ У ПЕЧІНЦІ БІЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ ГІПЕРОКСІЇ

В. В. Мацинін

Лабораторія гіпо- і гіпероксії
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Ще у 1878 р. Поль Бер [22] прийшов до висновку, що підвищений барометричний тиск здійснює на організм токсичний вплив завдяки підвищеному тиску кисню. Причому, тиск у 3 атм призводить до посилення окисних процесів, а при тиску в 5 атм вони знижуються і можуть зовсім припинитися.

Внаслідок дальших досліджень вдалося виявити цілий комплекс реакцій організму у відповідь на дію підвищеного парціального тиску кисню. Це різноманітні порушення функції центральної нервової системи аж до виникнення судорог і коматозного стану; зовнішнього дихання і серцево-судинної системи; зміни інтенсивності обміну речовин і термогенезу тощо [1, 5, 6, 7, 12, 13, 18, 20, 28, 32].

Значна кількість праць присвячена з'ясуванню біохімічних механізмів токсичної дії підвищеної концентрації кисню на живі структури. Стейді і Хогард [31] у дослідях, в яких гомогенати печінки білих щурів піддавали дії кисню під тиском 7 ата протягом двох годин, відзначали зниження активності сукциндегідази. Водночас у щурів, вбитих 20-хвилинною дією кисню при 8 ата, активність сукциндегідрогепази тканини мозку не змінилась. Також нечутливими до дії гіпероксії 7 атм виявились цитохром С та цитохромоксидаза. Стейді та ін. [30] виявили у середовищі з тиском кисню 6—8 ата уповільнення його споживання зрізами тканини. Підвищення інтенсивності окисного фосфорилування зрізами мозку при безпосередній дії кисню під тиском 8 атм на 22% спостерігали Броновицька і Гершеневич [4]. Вони також відзначали, що інтенсивність дихання і окисного фосфорилування зрізів кори головного мозку щурів, які зазнавали дії 6 атм чистого кисню та інтактних тварин, практично не відрізнялись.

Гольдштейн з співроб. [26] в умовах гіпероксії спостерігали майже подвійне збільшення ферментного β -гідроксилування (^3H) тираміну. У дослідях на білих щурах після дії кисню під тиском 5 ата протягом 30, 60 та 90 хв Сандерс і Холл [29] відзначали зниження вмісту АТФ після 30 та 90-хвилинної експозиції і відновлення до вихідного рівня — після 60-хвилинної; зниження АТФ-азної активності після 90-хвилинної експозиції і прогресуюче збільшення лужності крові в міру збільшення тривалості перебування тварин у гіпероксичному середовищі. Діксон і співроб. [25] висловили припущення про участь у механізмі кисневого отруєння сполук, що містять флавін.

Зниження активності декарбоксилази глютамінової і вмісту гамма-аміномасляної кислот у мозку білих щурів в умовах гіпероксії (4—6 ата) відзначається в дослідженнях Щербакової [17].

Чанс і співроб. [23] у дослідях на тваринах і препаратах мітохондрій, вивчаючи методом флуориметрії ступінь окислення — відновлення піридин-нуклеотиду в умовах дії кисню під тиском до $2,7 \text{ атм/см}^2$, виявили значний ступінь окислення цієї ланки дихального ланцюга, що супроводжується гальмуванням транспорту електронів у процесах, пов'язаних з утворенням енергії. Значну роль у механізмі токсичної дії кисню під високим тиском автори відводять необоротній інактивації за цих умов дегідрогеназ.

У літературі наводяться дані [30] щодо інактивації в умовах гіпероксії циклу Кребса.

Незважаючи на різноманітність проявів впливу кисню у високих концентраціях, можна виділити деякі основні шляхи його токсичної дії. Зокрема, його безпосередня реакція з сіркувмісними сполуками, окислення сульфгідрильних груп деяких ферментів, їх інактивація; порушення енергоутворення в організмі. Робляться припущення, що механізм токсичності кисню при високому тиску полягає у прямому окисленні дитіолової половини альфа-ліпоевої кислоти. Хогард [27] спостерігав у середовищі 100%-ного кисню зниження його споживання гомогенатами серця і мозку. Автор підкреслює, що найбільш чутливим до дії кисню є не субстрат, а утворення макроергічних фосфатів. Оскільки найбільш легко гальмується окислення піровиноградної кислоти, Хогард припускає, що механізм токсичної дії кисню на обмін пірувату включає окислення речовини, що містить SH-групу коферменту А. Ці висловлювання добре узгоджуються з даними літератури про те, що первинними акцепторами енергії у процесі переносу ацетильних груп, окисленні піровиноградної і α -кетоглутарової кислот є тіосполуки (тіоефірні похідні коензиму А) [16]. Проте існують і заперечення щодо окремих пунктів цього механізму [19].

Наші дослідження присвячені вивченню інтенсивності дихання і окисного фосфорилування у препаратах мітохондрій та гомогенатах печінки білих щурів, що зазнавали дії гіпероксії. Базуючись на наведених даних літератури про переважний вплив кисню під високим тиском на активність ферментів, пов'язаних з утилізацією піровиноградної, α -кетоглутарової та янтарної кислот, ми обрали за субстрати солі цих кислот.

Всього проведено дві серії дослідів із застосуванням кисню під тиском 4 та 5 *ата* протягом, відповідно, 15 та 60 *хв*. Згідно з формулою Дікенса [24], для розрахунку часу (*t*) розвитку симптомів токсичної дії кисню під тиском *P атм*: $\log t = 3 - 2,6 \log P$, у першій серії були застосовані сумарні дози, вдвое нижчі токсичних (15 *хв* проти 27,2 *хв*), а у другій вони майже в чотири рази перевищували розрахункові токсичні (60 *хв* проти 15,2 *хв*). Крім того, ми брали до уваги спостереження І. Ф. Соколянського про те, що в атмосфері чистого кисню під тиском 4 *ата* напруження кисню у м'язах і печінці білих щурів наближається до максимального рівня здебільшого до 15-ї *хв*.

Методика досліджень

У дослідях були використані білі щури жіночої статі вагою 160—180 г. Стан гіпероксії створювали у камері підвищеного тиску місткістю 18 л. Швидкість компресії і рекомпресії становила 1 *атм/хв*. Мітохондрії виділяли за існуючою методикою [14] у середовищі, що у першій серії містило 0,25 М сахарози, а у другій — 0,27 М сахарози, 0,001 М ЕДТА, 0,05 М ТРІС [3], що забезпечувало досить високу стабільність рН. Інкубацію проводили у середовищі Чанса [22]: Na^+ — 0,038 М, K^+ — 0,087 М, Mg^{++} — 0,006 М, Cl^- — 0,096 М, HPO_4^{--} — 0,013 М, H_2PO_4^- — 0,003 М. Сюди ж додавали 0,05 М глюкози. У середовище з акцепторами фосфату додатково вносили 0,0002 М АТФ і 0,03 мг гексокінази [9]. рН середовища 7,4—7,5. Динаміку змін кон-

центрації кисню у полярографічній ячійці реєстрували шляхом хроноамперометрії на полярографі типу LP-60 за допомогою відкритих платинових електродів у скляній ізоляції [11]. Слід використовувати легкоплавкі сорти скла. Виготовлені за нашим методом електроди виявились досить стабільними і забезпечували відтворюваність результатів. Про ступінь спряженості судили за відношенням кількості кисню, споживаного препаратами тканин у середовищі з системою акцепторів фосфату і без неї, тобто за величиною дихального контролю (ДК) [22]. Білок визначали за біуретовою реакцією. Споживання кисню виражали у мікроатомах у розрахунку на 1 мг білка за хвилину. Реєстрацію дихання препаратів тканин від тварин груп «контроль» і «дослід» провадили паралельно у межах кожного окремого дослід. Результати дослідів оброблені методами варіаційної статистики.

Результати досліджень та їх обговорення

У першій серії дослідів (12 тварин — «контроль» та 18 — «дослід») після 15-хвилинної дії кисню під тиском 4 *ата* в середовищі без акцепторів фосфату ми спостерігали зниження споживання кисню мітохондріями печінки. Результати цих досліджень наведені в табл. 1.

Таблиця 1
Споживання кисню мітохондріями печінки білих щурів після 15-хвилинної дії гіпероксії 4 *ата* (мкат кисню/мг білка/1 хв)

Статистичні показники	Сукцинат		α-кетоглутарат	
	контроль	дослід	контроль	дослід
<i>M</i>	0,0110	0,0075	0,0125	0,0042
$\pm m$	0,0017	0,0010	0,0016	0,0006
<i>p</i>		<0,01		<0,01

З наведених даних видно, що короткочасна дія ПТК (підвищеного тиску кисню) викликає зниження споживання кисню на 32 (сукцинат) — 66 (α-кетоглутарат) процентів.

У другій серії досліджень провадили спостереження за приростом дихання препаратів тканин у середовищі з системою акцепторів фосфату (ДК), загальним станом тварин, температурою їх тіла.

У більшості дослідів 60-хвилинна дія ПТК у 5 *ата* супроводжувалась значним пригніченням (аж до виникнення коматозного стану), дихання ставало поверхневим, частим; спостерігалось різке пригнічення або майже повне зникнення реакцій тварин на зовнішні подразники. Цей стан можна класифікувати, як термінальну стадію кисневого отруєння [6, 7, 13]. Деякі тварини гинули. Ректальна температура після рекомпресії виявилась зниженою на 3—3,5° С.

Порівняння паралельних записів дихання мітохондрій і гомогенатів у межах окремих дослідів виявило більш високий рівень споживання кисню і більш низький ступінь спряження у препаратах тканин від тварин групи «дослід» (95—98%-на вірогідність різниці при обробці альтернативним методом). Ця тенденція зберігалась також щодо середніх цифрових величин по групах дослідів (табл. 2).

Наведені у табл. 2 дані свідчать про те, що після дії токсичних доз кисню (5 *ата* — 60 хв) інтенсивність дихання препаратів тканини печінки у середовищі «без системи» з сукцинатом статистично достовірно підвищується на 41 (мітохондрії) — 16 (гомогенат) процентів. У решти проб величини приросту споживання кисню в групі «дослід» виявились статистично недостовірними за рахунок відносно нижчого стимулюючого впливу системи акцепторів фосфату в групі «дослід» у

порівнянні з контролем. У дослідах з піруватом спостерігалась аналогічна тенденція, протє величини різниці статистично невірідні.

Оскільки інтенсивність споживання кисню в середовищі без акцепторів фосфату характеризує вільне, не пов'язане з утворенням макроергів дихання, можна припустити, що в описаних дослідах відзначалось деяке роз'єднання дихання і фосфорилування. Це припущення підтверджується даними щодо величин дихального контролю (табл. 3), що безпосередньо характеризує ступінь спряження дихання і фосфорилування.

Таблиця 2

Споживання кисню мітохондріями (а) і гомогенатами (б) печінки білих щурів після 60-хвилинної дії гіпероксії 5 ата (мкат кисню/мг білка/1 хв)

Статистичні показники	Контроль		Дослід	
	Середовище інкубації тільки з глюкозою	Середовище інкубації + глюкоза + АТФ + гексокіназа	Середовище інкубації тільки з глюкозою	Середовище інкубації + глюкоза + АТФ + гексокіназа
Сукцинат				
а				
$M \pm m$	$0,0090 \pm 0,0014$	$0,0117 \pm 0,0050$	$0,0127 \pm 0,0015$	$0,0205 \pm 0,0067$
p			$< 0,001$	$> 0,2$
б				
$M \pm m$	$0,0201 \pm 0,0049$	$0,0278 \pm 0,0075$	$0,0233 \pm 0,0057$	$0,0334 \pm 0,0066$
p			$< 0,001$	$< 0,1$
Піруват				
а				
$M \pm m$	$0,0029 \pm 0,0008$	$0,0046 \pm 0,0012$	$0,0033 \pm 0,0010$	$0,0054 \pm 0,0015$
p			$< 0,2$	$< 0,2$

У табл. 3 наводиться по два значення вірогідності можливої помилки: одне з них, p , відноситься до величини різниці, а p' — до вірогідності напрямку змін.

Таблиця 3

Величини дихального контролю у препаратах мітохондрій і гомогенатів печінки білих щурів після 60-хвилинної дії гіпероксії 5 ата

Статистичні показники	Контроль		Дослід	
	сукцинат	піруват	сукцинат	піруват
Мітохондрії				
$M \pm m$	$1,73 \pm 0,14$	$1,64 \pm 0,18$	$1,44 \pm 0,12$	$1,38 \pm 0,10$
p			$> 0,1$	$> 0,2$
p'			$< 0,02$	$< 0,05$
Гомогенат				
$M \pm m$	$1,77 \pm 0,21$	—	$1,48 \pm 0,10$	—
p			$> 0,2$	
p'			$> 0,05$	

Базуючись на даних табл. 3, можна зробити висновок, що період післядії кисню у токсичних дозах супроводжується тенденцією до роз'єднання вільного окислення і фосфорилування у мітохондріях піддослідних тварин. Незважаючи на відсутність статистичної дост-

вірності різниці, можна відзначити певний паралелізм у спрямованості реакцій препаратів тканин у відповідь на зазначені дії.

Досить несподіваним для нас була протилежна спрямованість змін інтенсивності дихання препаратів мітохондрій у першій і другій серіях дослідів і зниження температури тіла водночас з тенденцією до роз'єднання процесів вільного і фосфорилуючого окислення. Результати наших дослідів не дають прямої відповіді на ці розбіжності. Тут можна провести деяку аналогію з працею Сандерса і співроб. [29] щодо ролі фактору часу у дії ПТК на організм. Очевидно, у першій серії сумарна доза ПТК призвела лише до тимчасового гальмування активності ланок, що забезпечують потік електронів у дихальному ланцюгу, і цей стан можна порівняти з рефлекторним гальмуванням зовнішнього дихання в атмосфері чистого кисню [11].

Щодо другої серії дослідів, де застосовувались токсичні дози ПТК, здається імовірним навести такі міркування щодо механізму часткового роз'єднання вільного і фосфорилуючого окислення.

По-перше, ПТК, призводячи до необоротних змін дегідрогеназ, викликає нагромадження недоокислених продуктів обміну, розвиток «гіпероксичної гіпоксії» у тканинах; посилений розпад макроергів супроводжується нагромадженням аденолової, АМФ і АДФ кислот — основних акцепторів фосфату [2]. У цьому випадку перевага вільного окислення, що на думку Скулачова [14, 15], бере участь в окисленні недоокислених продуктів обміну, може бути наслідком ліквідації стану кисневої заборгованості і детоксикації [10].

По-друге, не виключено, що часткове роз'єднання (по аналогії з міркуванням Скулачова [14]) у наших дослідях спрямоване на ресинтез макроергів менш економічним шляхом — шляхом прискорення потоку електронів з обходом «повільних» або ушкоджених ділянок дихального ланцюга. У такому разі роз'єднання можна розглядати, як вірогідний компенсаторний механізм. Це припущення у певній мірі підтверджується більш високим приростом вільного дихання у групі «дослід», де субстратом був найбільш потужний донор електронів дихального ланцюга — сукцинат [8].

У світлі наведених міркувань стає можливим пояснення зниження температури тіла тварин на фоні переваги вільного дихання: посилений потік електронів спрямований на окислення метаболітів і ресинтез макроергів, але не на вироблення тепла. Звичайно, це лише припущення, що потребують перевірки експериментом.

Висновки

1. Після 15-хвилинного перебування білих щурів в атмосфері чистого кисню при 4 *ата* інтенсивність дихання препаратів мітохондрій печінки у них знижується.

2. Після 60-хвилинного перебування білих щурів в атмосфері чистого кисню при 5 *ата* спостерігається значне пригнічення функції центральної нервової системи, ослаблення зовнішнього дихання, зниження на 3—3,5°С ректальної температури, зниження величини дихального контролю у препаратах мітохондрій і гомогенатів печінки за рахунок переваги вільного окислення.

Література

1. Агаджанян Н. А. и сотр.— Космич. биол. и мед., 1968, 2, 30.
2. Белицер В. А., Цыбакова Е. Т.— Биохимия, 1939, 4, 5, 516.
3. Бирк Р. В.— Вопросы мед. химии, 1967, 13, 3, 307.

4. Брновицкая З. Г., Гершенович З. С.—Биохимия, 1960, 25, 6, 981.
5. Граменицкая Е. С.—В кн.: Всес. конфер. по теплообмену и теплорегул., Л., 1967, 19.
6. Жиронкин А. Г., Панин А. Ф., Сорокин П. А.—Влияние повыш. парциальн. давления кислор. на организм человека и животн., Л., 1965.
7. Зальцман Г. Л.—Физиол. основы пребывания человека в условиях повыш. давления газовой среды, Л., 1961.
8. Кондрашова М. Н.—В кн.: Митохондрии. Ферментативные процессы и их регуляция, М., 1968, 122.
9. Курський М. Д., Федоров О. М., Гуленко Н. М.—Укр. біохім. журн., 1968, 40, 1, 11.
10. Маслова Г. М., Райхман Л. М., Скулачев В. П.—Успехи соврем. биол., 1969, 67, 3, 400.
11. Мацынин В. В.—В кн.: Матер. III конфер. физиол. Средней Азии и Казахстана, Душанбе, 1966, 237.
12. Мацынин В. В.—В кн.: Полярограф. определ. кислорода в биол. объектах, К., 1968, 64.
13. Сиротинин Н. Н.—В кн.: Кислородная терапия и кислородная недостат., К., 1952, 148.
14. Скулачев В. П.—Соотнош. окисл. и фосфорил. в дыхат. цепи, М., 1962.
15. Скулачев В. П.—Аккумуляция энергии в клетке, М., 1969.
16. Шапот В. С.—Успехи соврем. биол., 1954, 37, 3, 255.
17. Щербак Г. В.—ДАН СССР, 1962, 146, 5, 1213.
18. Bean J.—Physiol. Reviews, 1945, 25, 1, 2.
19. Begin-Heick N., Hochstein P., Hill G.—Canad. J. Physiol., Pharmacol., 1969, 47, 4, 400.
20. (Benichoux R., Kloppe R. et al.) Бенита Р., Клоппер Р. и др.—В кн.: Лечение повышенным давлением кислорода, М., 1968, 34.
21. (Bert P.) Берт П.—О влиянии повышенного барометрического давления на животный и растительный организм, Петроград, 1916.
22. Chance B., Williams G.—J. Biol. Chem., 1955, 217, 395.
23. Chance B., Jamieson D., Coles H.—Nature, 1965, 206, 257.
24. Dickens F.—In: Neurochemistry, 1955, 2, 851.
25. Dixon M., Maynard P., Morrow P.—Nature, 1960, 186, 1032.
26. Goldstein M., Tong Hyub Joh—Biochem., Biophys. Acta, 1967, 146, 2, 615.
27. (Haugard N.) Хогард Н.—В кн.: Лечение повышенным давлением кислорода, М., 1968, 24.
28. (Moulder P., Daikoff G., Rams V., Adams W.) Молдер П., Дейкофф Г., Рамс В., Адамс В.—В кн.: Лечение повышенным давлением кислорода, М., 1968, 34.
29. Sanders A., Hall J.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 125, 3, 716.
30. Stadie W., Rigg R., Haugard N.—Amer. J. Med. Sci., 1944, 207, 84.
31. Stadie W., Haugard N.—J. Biol. Chem., 1945, 161, 1, 153.
32. Winter P., Gupta R., Michalski A., Lanpier E.—J. Appl. Physiol., 1967, 23, 954.

Надійшла до редакції
30.V 1969 р.

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN THE LIVER OF ALBINO RATS AFTER HYPEROXY EFFECT

V. V. Matsynin

*Laboratory of Hypo- and Hyperoxy, the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev*

Summary

In experiments on albino rats the effect of hyperoxy of 4 ata for 5 min (the first series) and of 5 ata for 60 min (the second series) on respiration and phosphorylation in preparations of mitochondria and in the liver tissue homogenates was studied. A decrease in oxygen consumption by the liver mitochondria was observed in the first series. In the second series an increase of oxygen consumption in the environment without phosphate acceptors and a decrease of respiratory control value in preparations of mitochondria and homogenates were observed.

The possible mechanisms of the found reactions are discussed.