

СТАН ОКИСНИХ ПРОЦЕСІВ У ПЕЧІНЦІ БІЛИХ ЩУРІВ У РІЗНІ СТРОКИ ПІСЛЯ ДІЇ ГІПЕРОКСІЇ

В. В. Мацинін, Н. П. Зайцева, М. В. Полянчук

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

Більшість досліджень по вивченню впливу гіпероксії на організм, зокрема, на перебіг окисних процесів у тканинах, проведено під час або безпосередньо після дії кисню під високим тиском (ПТК) на препарати тканин чи цілий організм [1, 2, 4, 5, 8, 11, 12, 16, 30, 31, 32, 35, 36, 37 та ін.]. В літературі наводяться переконливі дані щодо інактивації киснем у токсичних дозах деяких ферментів і коферментів, безпосередньо пов'язаних з постачанням атомів водню у дихальний ланцюг: дегідрогенази, КоА, НАД, α -ліпоева кислота та деякі інші [26—29, 31, 34, 36, 39].

Тварини, що перенесли дію токсичних доз ПТК і залишилися живими, через кілька годин за зовнішнім виглядом і поведінкою можуть не відрізнятися від інтактних. Але при більш детальному дослідженні спостерігається цілий ряд розладів у функції різних систем. Зокрема Граменицька [9] виявила у кроликів переважання фактичного теплоутворення над розрахунковим, що тривало до двох — п'яти діб після дії ПТК 4 ата протягом 60 хв. Брэдлей і Воросмарті [24] спостерігали підвищення осмотичної проникності еритроцитів у водолізів після 120-хвилинного, з перервами по 15 хв, перебування під водою і дихання чистим киснем під тиском 1,8 ата навіть після 48 год перебування в нормальній атмосфері. Габібов [7] відзначив підвищення вмісту аміаку у мозку щурів у період до 40 діб після дії гіпероксії 6 ата. Граменицький і Арсеньєва [10] вказують на розвиток загальних розладів рухливості, тривалістю до кількох діб після короточасної дії гіпероксії. Достовірне підвищення активності альдолази фруктозо-1,6-фосфату і трансамінази глутаміношавлевооцтової кислоти в дослідках на кроликах через добу після 90-хвилинної дії кисню під тиском 3 ата відзначили Михайлов та ін. [19].

В наших раніше проведених дослідженнях вивчалось окисне фосфорилування у препаратах мітохондрій і гомогенатах печінки білих щурів безпосередньо після дії гіпероксії в токсичній дозі. У даній статті йдеться про вплив ПТК на окисне фосфорилування в аналогічних препаратах, одержаних від тварин безпосередньо після дії ПТК і через добу після неї.

Методика досліджень

Досліди проведені на білих щурах вагою 140—180 г лінії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР. Тварин піддавали дії гіпероксії 4 ата протягом 60 хв у камері підвищеного тиску кисню місткістю 20 л. Швидкість компресії і рекомпресії в усіх дослідках становила 1 атм/хв.

Препарати мітохондрій і гомогенати готували з печінки — органа, що за чутливістю до токсичної дії кисню стоїть на другому місці після мозку [29]. Застосований у наших дослідженнях режим, згідно з розрахунками Дікенса [27, 29] і клінічними проявами симптомів кисневого отруєння [11], можна кваліфікувати як токсичний.

Мітохондрії виділяли у середовищі, що містило 0,27 моль сахарози, 0,05 моль тріс, 0,001 моль ЕДТА [3], рН 7,4—7,5, методом диференціального центрифугування [22]. Середовище інкубації готували за Чансом [25] з тією лише різницею, що з нього

був виключений фтористий натрій і внесена глюкоза [14]. Субстратом був узятий сукцинат.

Інтенсивність дихання визначали хроноамперометричним методом, використовуючи відкриті платинові електроди [17], реєстрація — на полярографі типу ЛП-60. Проступив сприяє вільного дихання і фосфорилування судили за величиною дихального контролю (ДК) [14, 20, 25], розраховуючи її з відношення показників споживання кисню в середовищі з акцепторами фосфату (АТФ + гексокіназа + глюкоза) і без них.

У кожному досліді паралельно реєстрували дихання препаратів мітохондрій і гомогенатів від тварин з груп «дослід» і «контроль», одержані цифрові дані обробляли і порівнювали між собою в межах кожного окремого досліді.

Результати досліджень та їх обговорення

Так само, як і в наших раніше проведених дослідженнях [18], вплив токсичної дози гіпероксії (4 ата протягом 60 хв) супроводжується розвитком стану кисневого отруєння, за ступенем близьким до термінального. Відомості про інтенсивність дихання мітохондрій у першій серії дослідів (31 тварина, в тому числі: 12 контроль і 19 — дослід, забиті зразу ж після рекомпресії) наведені у табл. 1. Ці дані свідчать про те,

Таблиця 1

Споживання кисню мітохондріями печінки білих шурів,
вбитих зразу після дії гіпероксії 4 ата — 60 хв
(в мкА кисню/мг білка/хв)

Статистичні показники	Середовище інкубації			
	тільки з глюкозою	глюкоза + АТФ + гексокіназа	тільки з глюкозою	глюкоза + АТФ + гексокіназа
	Контроль		Дослід	
$M \pm m$	0,0250 ± 0,0020	0,0390 ± 0,0041	0,0330 ± 0,0027	0,0380 ± 0,0031
p			<0,05	<0,5

що токсичні дози кисню викликають статистично достовірне посилення споживання кисню мітохондріями в середовищі без акцепторів фосфату в середньому на 24%, тоді як при додаванні фосфоракцептуючої системи споживання кисню в групах «контроль» і «дослід» практично не відрізнялися. Аналогічні дані були одержані нами раніше [18] при застосуванні 5 ата протягом 60 хв.

Внаслідок таких змін у співвідношенні вільного і зв'язаного з фосфорилуванням окислення в мітохондріях були одержані відповідні величини ДК. Ця тенденція зберігалась і щодо дослідів з гомогенатами. На жаль, у цій серії дослідів ми не мали змоги провести розрахунки споживання кисню на мг білка. Тому ми лише мали змогу порівнювати показники дихального контролю. Результати цих спостережень наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Величини дихального контролю в препаратах мітохондрій і гомогенатах печінки білих шурів, забитих зразу після дії гіпероксії 4 ата — 60 хв

Статистичні показники	Мітохондрії		Гомогенат	
	контроль	дослід	контроль	дослід
$M \pm m$	1,84 ± 0,08	1,41 ± 0,06	2,62 ± 0,22	1,94 ± 0,17
p		<0,001		<0,02

Отже, в догається статист хання і фосфор порівняти з роз кі за величиною лід» вільне оки вання — зниже

Результати дослід), які пр табл. 3. Тут та

Споживання кисн забитих на другу

Статистичні показники	тільки
-----------------------	--------

СК $M \pm m$ 0,02
 p

ДК $M \pm m$
 p

СК $M \pm m$ 0,02
 p

ДК $M \pm m$
 p

нання вільного «дослід» вияви (гомогенат) пр зниження резер тварин групи « з додаванням а ного дихання і ж, як і в поперед ПТК, то дихан групі «дослід» такої розбіжно деться провес одержаних рез впливом токсич пей спряженос пюгу. Цей ста у дослідях з

Зіставленн ними значною досліджень, а

В дослідях ПТК in vitro п органічного фо у неорганічний сах у групах «1

Отже, в дослідях з мітохондріями і гомогенатами печінки спостерігається статистично достовірна тенденція до роз'єднання вільного дихання і фосфорилування. Якщо одержані розбіжності у показниках ДК порівняти з розходженнями величин вільного дихання, одержимо близькі за величиною і зворотні за спрямованістю відхилення: у групі «дослід» вільне окислення виявляється збільшеним на 24%, а фосфорилування — зниженим на 30—35%.

Результати другої серії дослідів (11 тварин — контроль і 18 — дослід), які провадились на другу добу після дії ПТК, наведені у табл. 3. Тут так само, як і в попередній серії, спостерігається роз'єд-

Таблиця 3

Споживання кисню (СК) мітохондріями (а) і гомогенатами (б) печінки білих шурів, забитих на другу добу після дії гіпероксії 4 ата — 60 хв (в мкА кисню/мг білка/хв) і величини дихального контролю (ДК)

Статистичні показники	Середовище інкубації			
	тільки з глюкозою	глюкоза+АТФ+гексокіназа	тільки з глюкозою	глюкоза+АТФ+гексокіназа
	Контроль		Дослід	
	а			
СК $M \pm m$	0,0248±0,0017	0,0450±0,0030	0,0177±0,0010	0,0240±0,0018
p			<0,001	<0,001
ДК $M \pm m$	1,77±0,085		1,28±0,028	
p				<0,001
	б			
СК $M \pm m$	0,0213±0,0014	0,0461±0,0030	0,0251±0,0009	0,0401±0,0030
p			<0.05	<0,2
ДК $M \pm m$	2,39±0,095		1,77±0,050	
p				<0,001

нання вільного дихання і фосфорилування: показники ДК в групі «дослід» виявилися нижчими щодо контролю на 28 (мітохондрії) — 26 (гомогенат) процентів. У цій серії також спостерігається тенденція до зниження резервної здатності препаратів мітохондрій і гомогенатів від тварин групи «дослід» до прискорення споживання кисню в середовищі з додаванням акцепторів фосфату. Але, якщо тенденції у змінах вільного дихання і фосфорилування в гомогенатах були загалом такими ж, як і в попередніх дослідженнях із застосуванням токсичних доз ПТК, то дихання мітохондрій у середовищі без акцепторів фосфату в групі «дослід» виявилось нижчим, ніж у контролі. З'ясувати причину такої розбіжності нам не вдалось. Очевидно, в цьому напрямку доведеться провести додаткові дослідження. А поки, ґрунтуючись на одержаних результатах досліджень, можна зробити висновок, що під впливом токсичних доз кисню спостерігається закономірне зниження ступеня спряженості вільного дихання і фосфорилування у дихальному ланцюгу. Цей стан зберігається, принаймні, протягом доби і виявляється у дослідях з мітохондріями і гомогенатами.

Зіставлення результатів наших спостережень з літературними даними значною мірою утруднюється різницею у виборі об'єктів і методів досліджень, а також режимів дії.

В дослідях Бронувицької і Гершеневича [5] із застосуванням 8 ат ПТК *in vitro* про інтенсивність фосфорилування судили за вмістом неорганічного фосфату, АТФ, інтенсивністю включення міченого фосфору у неорганічний, кислоторозчинний фосфор і АТФ. Різниці у цих процесах у групах «контроль» і «дослід» не виявлено. Інтенсивність дихання

зрізів мозку від контрольних тварин і тварин, яких піддавали дії ПТК (6 ат до розвитку термінального стану), була майже однаковою. У печінці ж у дослідях *in vivo* відзначено зниження вмісту АТФ, дворазове зменшення інтенсивності окисного фосфорилування. У більш ранніх працях цих авторів [4, 8] із застосуванням також токсичних доз ПТК (4—6 атм тривалістю, відповідно, 120—42 хв) було відзначено зниження дихання і гліколізу в тканині мозку. Було висловлене припущення про можливість ураження киснем під високим тиском систем, що беруть участь у переносі фосфору з АТФ на системи, що фосфорилуються [4], а судорожні випадки забезпечуються якимись ще не вивченими джерелами енергії [8]. В дослідях Агаджаняна та ін. [1] на третю і десятю доби перебування білих щурів у середовищі, що містить 95 і 89% кисню, було відзначено зниження спряженості вільного і фосфорилуючого окислення в тканинах мозку, відповідно, на 40 і 50% за даними Р/О.

Сендерс і Холл [37] відзначають, що тканини тварин, яких піддавали дії ПТК до 5 ата з виразною втратою концентрації АТФ, проявляли підвищене дихання і резервну здатність до утворення АТФ.

Цікавими виявилися порівняння результатів наших дослідів з дослідженнями Граменицької, у яких спостерігалось переважання фактичного теплоутворення над розрахованим за газообміном після дії гіпероксії. Згідно з існуючим уявленням щодо зв'язку ступеня спряженості дихання і фосфорилування з теплоутворенням, на основі літературних даних [9] за таких умов слід було чекати роз'єднання вільного окислення і фосфорилування. І цей стан мав зберігатися протягом двох—п'яти діб. Певною мірою це припущення підтвердилось нашими спостереженнями—ступінь спряженості процесів вільного і фосфорилуючого окислення в мітохондріях білих щурів, яких піддавали дії токсичних доз кисню, був нижчим, ніж у контролі і залишався зниженим ще протягом доби.

Висловлені припущення добре узгоджуються з літературними даними про інактивацію киснем під високим тиском ряду ферментів і коферментів дихання. Неабияке значення у цих процесах має стан самих мітохондрій, що відбивається на ступені спряженості вільного окислення і фосфорилування [15, 21]. В літературі наведені відомості щодо таких змін. Так, Виноградов та ін. [6] спостерігали набрякання мітохондрій і розлади організації крист у міокарді мишей після 56 год перебування їх у середовищі, що містить 96—98% кисню.

Грунтуючись на літературних даних і результатах наших власних спостережень, можна зробити висновок, що гіпероксія викликає досить стійкі зміни у мітохондріях. У цьому відношенні згадані в літературі строки [7, 9, 19, 25 і ін.] можна вважати орієнтиром у визначенні тривалості періоду нормалізації стану організму після дії гіпероксії.

Висновки

1. Токсичні сумарні дози ПТК (4 ата протягом 60 хв) призводять до зниження ступеня спряженості вільного окислення і фосфорилування (за даними ДК) у препаратах мітохондрій і гомогенатах печінки білих щурів.

2. Зниження показників ДК зумовлено головним чином зниженням здатності препаратів тканини до прискорення дихання у середовищі з акцепторами фосфату.

3. Тенденція до роз'єднання вільного і фосфорилуючого окислення спостерігається як безпосередньо слідом за дією токсичних доз ПТК, так і через добу.

1. Агаджанян
2. Барсуков
3. Бирк Р. В.—
4. Бротовиц
5. Бротовиц
6. Виноградов
7. Габибов М.
8. Гершенови
9. Грамениц
10. Грамениц
11. Жиронкин
12. Иванова Т.
13. Каплан Е.
14. Курский М.
15. Лениндже
16. Львова С. І.
17. Мацинн В.
18. Мацинн В.
19. Михайлов
20. Рачев Р. Р.—
21. Скулачев
22. Скулачев В.
23. Begin-Heic
24. Bradley M.
25. Chance B.
26. Chance B.
27. Dickens F.
28. Dickens F.
29. Dickens F.
30. Fati S., Pei
31. Goldstein
32. Hall J., Sa
33. Haugaard
34. Horn R., Ha
35. Sanders A.
36. Sanders A.
37. Sanders A.
38. Stadie W.
39. Thomas J.

Література

1. Агаджанян Н. А. и др.—Космич. биол. и мед., 1968, 2, 30.
2. Барсуков В. А., Леонов А. Н.—В сб.: Матер. III научн. конфер. патофизиол. Север. Кавказа, Ростова-на-Дону, 1969, 34.
3. Бирк Р. В.—Вопросы мед. химии, 1967, 13, 3, 307.
4. Броновицкая З. Г.—В кн.: Тез. докл. научн. конфер. по физиол. и патол. дыхания, гипо- и гипероксии и кислород. терапии, К., 1955, 31.
5. Броновицкая З. Г., Гершеневич З. С.—Биохимия, 1960, 25, 6, 981.
6. Виноградов В. Н., Каплан Е. Я.—В кн.: Влияние повышен. давл. кислорода на организм, Ростов-на-Дону, 1969, 13.
7. Габиров М. М.—В кн.: Влияние повышен. давл. кислорода на организм, Ростов-на-Дону, 1969, 15.
8. Гершеневич З. С.—В кн.: Тез. докл. научн. конфер. по физиол. и патол. дыхания, гипо, гипероксии и кислород. терапии, К., 1955, 53.
9. Граменицкая Е. С.—В сб.: Всес. конфер. по теплообмену и теплорегул., Л., 1967, 19.
10. Граменицкий П. М., Арсеньева В. И.—В кн.: Влияние повышен. давл. кислорода на организм, Ростов-на-Дону, 1969, 25.
11. Жиронкин А. Г., Панин А. Ф., Сорокин П. А.—Влияние повышен. парциальн. давл. кислорода на организм человека и животных, Л., 1965.
12. Иванова Т. Н., Рубель Л. Н.—Журнал эвол. биохим. и физиол., 1969, 5, 3, 279.
13. Каплан Е. Я., Соловьев В. И.—В кн.: Влияние повышен. давл. кислорода на организм, Ростов-на-Дону, 1969, 39.
14. Курский М. Д., Федоров О. М., Гуленко Н. М.—Укр. біохім. журн., 1968, 40, 1, 11.
15. Ленинджер А.—Митохондрия, М., 1966.
16. Львова С. П.—В кн.: Вопросы физиол. биохим., зоол. и паразитол., Махачкала, 1968, III, 113.
17. Мацынин В. В.—В кн.: Полярограф. опред. кислорода в биол. объектах, К., 1968, 64.
18. Мацынин В. В.—Физиол. журн. АН УРСР, 1970, XVI, 4, 523.
19. Михайлов Ю. Е., Шимкевич Л. Л., Максимова И. Е., Кахновская В. Б.—В кн.: Влияние повышен. давл. кислорода на организм, Ростов-на-Дону, 1969, 56.
20. Рачев Р. Р.—Митохондрии и тиреоидные гормоны, Л., 1969.
21. Скулачев В. П.—Соотношение окислительного и фосфорил. в дыхат. цепи, М., 1962.
22. Скулачев В. П.—Аккумуляция энергии в клетке, М., 1969.
23. Begin-Heick N., Hochstein P., Hill G.—Canad. J. of Physiol. and Pharmacol., 1969, 47, 4, 400.
24. Bradley M., Vorosmarti J.—Aerospace Med., 1968, 39, 5, 493.
25. Chance B., Williams G.—J. of Biol. Chem., 1955, 217, 305.
26. Chance B., Jamieson D., Coles H.—Nature, 1965, 206, 257.
27. Dickens F.—The Biochem. J., 1946, 40, 1, 145.
28. Dickens F.—The Biochem. J., 1946, 40, 1, 171.
29. Dickens F.—Neurochemistry, 1955, 631.
30. Fati S., Pennarola R., Santagota P.—Boll. Soc. Ital. biol. sperim., 1966, 42, 11, 665.
31. Goldstein M., Tong Hyub Joh.—Biochem., Biophys. Acta, 1967, 146, 2, 615.
32. Hall J., Sanders A.—Proc. Soc. Exptl. Biol., Med., 1966, 121, 1203.
33. Haugaard N.—Physiol. Rev., 1968, 48, 2, 311.
34. Horn R., Haugaard N.—J. Biol. Chem., 1966, 241, 3078.
35. Sanders A., Hall I., Cavanaugh P., Woodhall B.—Proc. Soc. Exptl. Biol., Med., 1966, 121, 1, 32.
36. Sanders A., Hall I.—Proc. Soc. Exptl. Biol., Med., 1966, 121, 1, 34.
37. Sanders A., Hall I.—Proc. Soc. Exptl. Biol., Med., 1967, 125, 3, 716.
38. Stadie W., Haugaard N.—J. Biol. Chem., 1945, 161, 1, 153.
39. Thomas J., Neptune E., Sudduth H.—Biochem. J., 1963, 88, 1, 31.

Надійшла до редакції
8.VI 1970 р.

STATE OF OXIDATIVE PROCESSES IN ALBINO RATS LIVER AT DIFFERENT TIME AFTER HYPEROXIA EFFECT

V. V. Matsynin, N. P. Zaitseva, M. V. Polyanchuk

Laboratory of Hypoxia and Hyperoxia, the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

In experiments with albino rats a free respiration and phosphorylation were studied in homogenates and mitochondria of the liver by means of chronamperometry. Animals were subjected to the effect of toxic doses of hyperoxia 4 ata for 60 min. In the first series of the experiments the observations were carried out immediately after recompression, in the second one — on the 2d day. In both series a decrease was observed in conjugation of free respiration and phosphorylation which was judged on by the respiratory control (RC) value. In most cases the RC decrease was conditioned by a comparatively less increment of the respiration rate of mitochondrion and homogenate preparations in the medium with addition of a system of phosphate acceptors (ATP-hexokinase + glucose). This phenomenon took place both immediately after recompression and on the 2d day. An assumption is advanced on the duration of the reactivation processes in the respiratory chain elements after a single effect of hyperoxia toxic doses.

ВП В НАВКОЛИ

Инсти

Останнім ч
сонної хвороби
тривалого диха
домо, що досить
високим парціал
невої тканини (15, 16, 20, 21, 22).
тварин в оксиге
джено порівняв

Досліди прове
Тварини знаходили
90%-ним вмістом к
такого самого часу
відповідала своя ко
виймали з камер, з
вали і зважували
другу, третю, четве
званий «легеневий н
ності розрахунків ч
багатьма авторами
[2, 5, 7, 10, 13]. Кр
логічне дослідження
парати забарвлювал
були статистично об

Р

Проведені д
сфері 60%-ного
виявлено. Леген
полю, чітко вид
легень та визна
і контрольними
експозицією. У
у піддослідних м
три доби дихан
зрівнявся.

Результати
наведені на рис.
суміші у трьох
Тканина органа
ві осередки запа
судатом, з розрі
нистої рідини. У
не було, але в р