

**Влияние предварительно введенного
в организм аспартата и его сочетания
с витаминно-коферментным комплексом
на катаболизм L-[¹⁴C]-аспартата в тканях
некоторых органов мышей в условиях
гермозамкнутого пространства**

Воздействие на организм факторов замкнутого неветилируемого пространства приводит к ускоренному катаболизму L-4-[¹⁴C]-аспартата до ¹⁴CO₂ в головном мозгу мышей. Поставка дополнительного количества L-аспартата в организм (предварительное подкожное его введение животным в дозе 100 мг/кг) приводит к усилению этой адаптивной реакции и продлевает жизнь животных в таких условиях. При этом усиливается накопление введенного аспартата в печени и головном мозгу и ускоряется его поступление в кровь из места введения. Одновременное (вместе с L-аспартатом) введение животным витаминно-коферментного комплекса пентапирувита, включающего тиаминпирофосфат, липоат, 4-фосфопантотенат натрия, никотинат и рибофлавинмононуклеотид, стимулирующего функцию ключевых звеньев цикла Кребса, приводит к усилению защитного эффекта L-аспартата и вызывает дальнейшую активизацию катаболизма L-аспартата в головном мозгу, причем преимущественно на поздних, предагональных, стадиях развивающегося патологического состояния. Приведенные результаты расцениваются как подтверждение того, что защитное действие L-аспартата при действии на организм факторов замкнутого пространства связано с его быстрым включением в метаболизм тканей, в частности, нервной.

Введение

Ранее мы сообщали о защитном действии L-аспартата (L-АСП) при пребывании животных в гермозамкнутом пространстве [1] и высказывали предположение, что этот эффект обусловлен быстрым включением L-АСП в метаболизм, поставкой энергетически важных субстратов цикла Кребса и повышением на некоторое время адаптационных возможностей организма в целом и головного мозга, в частности [1]. Это предположение косвенно подтверждено нашими данными о стимулирующем влиянии витаминно-коферментного комплекса, включающего тиаминпирофосфат, липоат, 4-фосфопантотенат, никотинат и флавинаденинмононуклеотид, на относительно медленную реакцию цикла Кребса в тканях — реакцию с участием α-кетоглутаратдегидрогеназы [5]. Ускорение этой реакции при условии функционального сопряжения с аспартаминотрансферазой на фоне нагрузки L-АСП создает предпосылки для более энергичного функционирования всего цикла Кребса (или, по крайней мере, ускоряет его быстрые реакции с участием дикарбоновых кислот), что может иметь адаптивное значение на определенных стадиях гипоксии [11].

В настоящем исследовании мы поставили перед собой задачу выяснить, происходят ли какие-либо изменения в катаболизме L-[¹⁴C]-АСП при действии на организм основных факторов замкнутого пространства, а также прямыми экспериментами определить интенсивность катаболизма L-[¹⁴C]-АСП в нервной ткани на этапах развития гипоксически-гиперкапнического поражения и при фармако-метаболической защите.

В экспериментах использовали самок мышей линии BaLb массой 18—20 г. Каждое животное помещали в индивидуальную герметически закрывающуюся камеру вместимостью 125 см³, моделируя таким способом острое воздействие [1]. При изучении катаболизма L-АСП животным подкожно вводили на физиологическом растворе смесь препаратов: немеченого (99 %) и меченого (1 %) L-АСП (100 мг/кг). В качестве меченого препарата использовали L-4-[¹⁴C]-АСП (удельная активность 2,0 ГБк/ммоль, фирма «Amersham», Великобритания). Снижение удельной радиоактивности меченого L-АСП учитывали при дальнейших расчетах. Контрольных (интактных) животных декапитировали через 5, 10, 20 и 40 мин после введения смеси немеченого и меченого препаратов L-АСП. Животных, подвергнутых воздействию факторами замкнутого пространства, забивали через 5 и 10 мин после введения смеси и помещения в камеру, а также через 16—18 мин (в период пика судорог). В момент декапитации собирали кровь из шейной раны, быстро извлекали головной мозг и печень. Ткани гомогенизировали в 0,05 моль/л растворе NaOH при объемном соотношении 1:10, кровь разводили этим же раствором в таком же соотношении. Гомогенаты наносили на мишени из нержавеющей стали, площадь активного пятна которых составляла 3,14 см². Радиоактивность подсчитывали с помощью 4л-газопоточного счетчика типа 2154-I-IM марки «Протока», принимая во внимание коэффициент гашения. Рассчитывали удельное накопление L-4-[¹⁴C]-АСП в тканях (мг/кг), а также следующие отношения: накопление в крови/накопление в мозгу и накопление в крови/накопление в печени.

При исследовании катаболизма меченого L-АСП до ¹⁴CO₂ животных помещали в индивидуальные гермокамеры после введения физиологического раствора (контрольная группа), после введения 100 мг/кг немеченого L-АСП, а также после его введения на фоне витаминно-коферментного комплекса пентапировита, включающего тиаминпирофосфат, липоат, 4-фосфопантотенат натрия, никотинат и рибофлавинмононуклеотид (подробно состав описан в работе Абу Асали и соавт. [1]). Животных извлекали из камер через каждые 2 мин, начиная с момента воздействия, а также в момент агональных судорог, быстро декапитировали, извлекали головной мозг, готовили гомогенаты на бидистиллированной воде (1:10) и далее оценивали скорость катаболизма добавляемого в концентрации 10 ммоль/л L-4-[¹⁴C]-АСП по методике, изложенной ранее [5]. Концентрация 10 ммоль/л выбрана как близкая к «физиологической» для гомогенатов мозга [3] в результате анализа кривой, полученной при изучении катаболизма L-АСП (возрастающих его концентраций) в предварительных экспериментах [6]. Для сравнения с нормальной скоростью катаболизма L-АСП исследовали группу интактных животных. Результаты экспериментов обработаны с использованием методов вариационной статистики [7].

Результаты и их обсуждение

Результаты оценки накопления меченого L-АСП в тканях некоторых органов и крови у интактных животных и у животных, подвергнутых воздействию факторами замкнутого пространства, представлены на рис. 1 и 2. Как видно из рис. 1, при подкожном введении L-АСП (100 мг/кг) наибольшее накопление метки наблюдается в ткани печени, причем оно превышает накопление метки в крови уже через 5 мин после его введения. Накопление метки в головном мозгу составляет примерно 1/3 ее содержания в крови и 1/6 ее содержания в печени. Во всех тканях содержание метки L-АСП нарастает вплоть до 40-й минуты после введения препарата, но темп нарастания разный. В ткани головного мозга накопление препарата после 20-й минуты почти выходит на плато, в то время как в крови и ткани печени продолжает-

ся прирост накопления. Как следствие этого, отношение кровь/мозг (рис. 2) значительно превышает отношение кровь/печень, значение которого меньше единицы. При этом хорошо заметно, что отношение кровь/мозг в ранние сроки после введения препарата имеет максимальные значения, которые затем снижаются и стабилизируются, в то время как отношение кровь/печень почти во все сроки наблюдения изменяется незначительно.

Эти результаты можно трактовать как свидетельство того, что печень чрезвычайно активно захватывает L-АСП из крови, причем изменение содержания L-АСП в крови,

по-видимому, в большей мере обусловлено скоростью его захвата печенью, чем поступлением в кровь из места введения. Поступление L-АСП в головной мозг происходит относительно медленно, равномерно и не за-

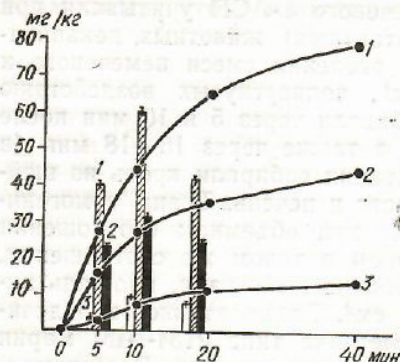


Рис. 1. Накопление (мг/кг) меченого L-4-[^{14}C]-аспартата в ткани печени (1), крови (2) и ткани головного мозга (3) после его введения интактным (кривые линии) и помещенным в гермозамкнутое пространство (столики) мышам.

висит от меняющегося отношения кровь/мозг. Кроме того, полученные результаты можно расценить как отражение функционирования специфических для L-АСП транспортных систем в составе гематоэнцефалического барьера, обеспечивающих сравнительно небольшой, но устойчивый перенос L-АСП в мозг против значительного градиента концентрации, что соответствует общепринятым представлениям [4, 10].

Пребывание животных в гермозамкнутом пространстве приводит к достоверным изменениям катаболизма L-АСП. В частности, уже через 5 мин после помещения в гермокамеру содержание меченого L-АСП в крови и тканях мозга и печени заметно возрастает, через 10 мин отмечается значительное увеличение содержания препарата в печени, незначительное (но достоверное) увеличение его содержания в головном мозгу и крови, а в момент достижения пика агональных судорог во всех тканях наблюдается достоверное снижение содержания L-АСП. При этом в первые 10 мин наблюдения значения отношения кровь/мозг и отношения кровь/печень изменяются незначительно по сравнению с контролем, и лишь в период агональных судорог оно оказывается повышенным в силу снижения накопления L-АСП в тканях мозга и печени (см. рис. 2).

Таким образом, в первые 10 мин пребывания в гермокамере накопление меченого L-АСП в ткани основных органов усиливается, вероятно, вследствие его усиленного катаболизма в этих тканях и повышения потребности в нем как в энергетическом субстрате, что сопряжено с изменением поступления L-АСП из места его введения. Наблюдаемые эффекты могут быть также связаны с ускорением кровообращения, возникающим в условиях гермозамкнутого пространства как следствие гиперкапнии [2] и имеющим на определенных этапах компенсаторное значение [8].

Предположение об ускоренном катаболизме L-АСП подтверждается прямыми экспериментами с использованием гомогенатов ткани головного мозга (рис. 3). Как видно из представленных результатов, уже через 2 мин после начала пребывания в гермокамере наблюдается достоверное ускорение катаболизма L-4-[^{14}C]-АСП в ткани мозга, этот процесс нарастает вплоть до 8-й минуты наблюдения, а впоследствии быстро ослабевает, возвращаясь к моменту агональных судорог к контрольным значениям. При предварительном инъецировании животным

немеченого L-АСП в качестве средства защиты в гомогенатах ткани головного мозга животных, находившихся в условиях гермокамеры, наблюдается схожая динамика катаболизма меченого L-АСП, при этом до $^{14}\text{CO}_2$ он расщепляется достоверно интенсивнее, чем в гомогенатах ткани незащищенных животных, а максимальное выделение $^{14}\text{CO}_2$ приходится на 10-ю минуту пребывания в гермокамере. Одновременное с L-АСП назначение витаминно-коферментного комплекса приводит к тому, что катаболизм меченого L-АСП в гомогенатах ткани мозга повышается еще в большей мере, однако до 10-й минуты наблюдения

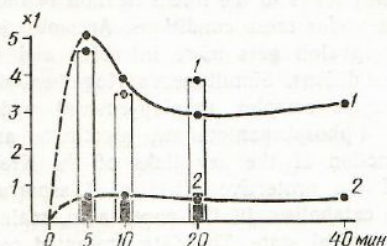


Рис. 2. Отопление значений накопления меченого L-4-[^{14}C]-аспартата «кровь—мозг» (1) и «кровь—печень» (2) для интактных (кривые линии) и помещенных в гермозамкнутое пространство (столбики) мышей.

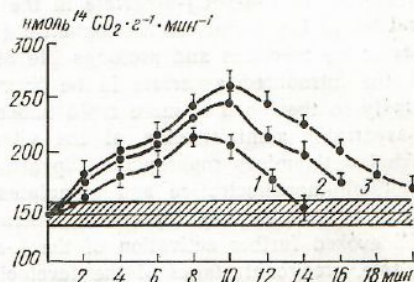


Рис. 3. Интенсивность катаболизма L-4-[^{14}C]-аспартата (нмоль $^{14}\text{CO}_2 \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) в гомогенате ткани головного мозга мышей в зависимости от длительности пребывания (мин) животного в условиях гермозамкнутого пространства без защиты от развития патологии (1) и с защитой аспартатом (2), аспартатом и витаминно-коферментным комплексом (3).

эти различия недостоверны, а в период с 12-й по 16-ю минуту статистически значимо превышают катаболизм L-4-[^{14}C]-АСП при защите экзогенным L-АСП. Продолжительность жизни при этом заметно удлиняется, как уже отмечалось ранее [1], и даже в период агональных судорог (20-я минута пребывания в гермозамкнутом неветилируемом пространстве) катаболизм меченого L-АСП в ткани головного мозга животных выше, чем в ткани мозга интактных животных.

Таким образом, воздействие факторов замкнутого неветилируемого пространства на организм приводит к ускоренному окислительному катаболизму L-АСП в головном мозгу, что является одним из проявлений адаптации нервной ткани к возникающему патологическому состоянию. Постановка дополнительного количества L-АСП в организм (предварительное его введение животным в дозе 100 мг/кг) приводит к усилению этой адаптивной реакции и продлевает жизнь в условиях гермокамеры. Характерно, что при воздействии факторами замкнутого пространства изменяется динамика инъецированного L-АСП, ускоряется его накопление в печени и головном мозгу. Одновременное (вместе с L-АСП) введение животным витаминно-коферментного комплекса, стимулирующего ключевые звенья цикла Кребса, приводящее к усилению защитного эффекта L-АСП, сопровождается дальнейшей активацией катаболизма L-АСП в нервной ткани, причем преимущественно на поздних, предагональных, стадиях патологического состояния. Приведенные результаты подтверждают, что защитное действие L-АСП при действии на организм факторов замкнутого пространства связано с включением L-АСП в общий метаболизм (в том числе и в метаболизм головного мозга) и повышением адаптивных возможностей организма на определенных этапах развивающегося патологического состояния.

EFFECT OF ASPARTATE PRELIMINARILY INTRODUCED
TO ORGANISMS
AND OF ITS COMBINATION WITH VITAMIN-COENZYME COMPLEX
ON CATABOLISM OF L-[¹⁴C]-ASPARTATE
IN TISSUES OF CERTAIN ORGANS OF MICE UNDER CONDITIONS
OF SEALED SPACE

Effect of factors of sealed non-aired space on the organism leads to the enhancement of catabolism of L-4-[¹⁴C]-aspartate in the mice encephalon to ¹⁴CO₂. Preliminary administration of L-aspartate to the organism (100 mg/kg) leads to the intensification of these adaptative reactions and prolongs life of animals under these conditions. Accumulation of the introduced aspartate in the liver and encephalon gets more intensive and its supply to the blood is more rapid under these conditions. Simultaneous (together with L-aspartate) administration of the vitamin-coenzyme complex (pentapyruvate) which includes thiaminepyrophosphate, lipoate, sodium 4-phosphopantotenate, nicotinate and riboflavin-mononucleotide and stimulates the function of the key links of the Krebs cycle to animals has induced intensification of the protective effect of L-aspartate and evoked further activation of the L-aspartate catabolism in the encephalon, mainly at late, preagonal stages of the developing pathological state. The data presented confirm that protective effect of L-aspartate, provided the effect of the closed space factors on the organism, is a result of its quick introduction, into energy metabolism of tissues, in particular, of the nervous tissue.

I. I. Mechnikov University, Odessa

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абу Асали И. И., Розанов В. А., Розанов А. Я.* Изучение защитного действия аминокислот — субстратов окисления, витаминов, коферментов и их комплексов при действии на организм факторов замкнутого пространства // Физиол. журн. — 1990. — 36, № 4. — С. 32—37.
2. *Малкин В. Б.* Влияние на организм искусственной газовой среды космических кораблей и станций. Барометрическое давление. Газовый состав // Основы космической биологии и медицины. — Т. 2, кн. 1. — М.: Наука, 1975. — С. 11—73.
3. *Нейрохимия* / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: ЛГУ, 1979. — 271 с.
4. *Палладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М.* Белки головного мозга и их обмен. — Киев: Наук. думка, 1972. — 314 с.
5. *Розанов В. А., Абу Асали И. И., Розанов А. Я.* Изучение нейрометаболических эффектов и антигипоксической активности витаминно-коферментного комплекса, включающего тиаминпирофосфат, липоат, 4-фосфо-пантотенат натрия, никотинат и флавинаденинмононуклеотид // Вопр. мед. химии. — 1990. — 20, № 4. — С. 25—28.
6. *Розанов В. А., Абу Асали И. И., Розанов А. Я.* Сравнительное изучение катаболизма меченых α-кетоглутарата, сукцината, аспартата и ГАМК в нервной ткани. Влияние пиридоксаль — 5' — фосфата // Укр. биохим. журн. — 1990. — 62, № 5. — С. 61—67.
7. *Сепетлиев Д.* Статистические методы в научных медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1968. — 419 с.
8. *Сулимо-Самуйлло З. К.* Гиперкапния и гипокания. — В кн.: Экологическая физиология человека: Адаптация человека к экстремальным условиям среды. — М.: Наука, 1979. — С. 454—494.
9. *Хочачка П., Сомеро Дж.* Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — 568 с.
10. *Sacks W.* Cerebral metabolism in vivo // Handb. of Neurochem. 2nd. ed. / Ed. A. Laytha. — New-York, L.: Plenum press, 1983. — P. 321—353.
11. *Kondrashova M. N., Grigorenko E. V., Kosenko E. A.* Rapid cycle of substrate oxidation under activation of energy metabolism // 5-th Europ. Bioenergetics Conf. — Aberystwyth, 1988. — P. 297.

Одес. ун-т им. И. И. Мечникова
М-ва высш. и сред. спец. образования Украины

Материал поступил
в редакцию 22.10.90