УДК 612.821.7:612.82:577.1

ВКЛЮЧЕНИЕ ¹⁴C-ЛЕЙЦИНА В БЕЛКИ МЕМБРАН СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ КИСЛОРОДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

ШЕРСТНЕВ К. Б., СУЛЕЙМАНОВ А. К., КРИЧЕВСКАЯ А. А.

Изложены результаты определения включения ¹⁴C-лейцина в белки мембран и содержания белков с различными молекулярными массами в мембранах субклеточных фракций мозга крыс при действии повышенного давления кислорода. Установлено ингибирование включения метки в белки мембран синапсом в острой форме кислородной интоксикации, которое сопровождается резким уменьшением содержания белков мембран синапсом с величиной M от 12 до 17 кД. Действие низких давлений кислорода вызывает достоверное увеличение включения ¹⁴C-лейцина во все исследованные мембраны субклеточных фракций. Полученные данные могут служить одним из обоснований применения низких давлений кислорода в медицинской практике.

На действие факторов внешней среды, по силе превышающих оптимальные условия обитания, организм отвечает универсальной реакцией усиления свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов и увеличения SH-групп белков [1]. Одним из непосредственных последствий этого является изменение свойств биологических мембран. Гипербарооксигенация (ГБО), которая в последние годы широко используется в медицинской практике [2] и многих областях народного хозяйства, представляет собой экстремальный фактор среды. Ее действие на все живые организмы проявляется, прежде всего, в значительном усилении реакций, которые ведут к образованию активных форм кислорода, генерации свободных радикалов и усилению перекисного окисления липидов, модификации активности ферментов [1, 3]. Сила действия ГБО определяется величиной давления кислорода и продолжительностью действия. Реакция на ГБО зависит от вида животного, возраста и физиологического состояния организма. ГБО ниже 0,5 МПа вызывает так называемую общетоксическую форму интоксикации, при которой на фоне глубокого нарушения метаболизма непосредственная гибель животного наступает от отека легких, остановки сердца. ГБО выше 0,4 МПа приводит к быстрому развитию неврологической формы интоксикации, которая характеризуется развитием судорог центрального происхождения [3, 4]. Если сеанс ГБО прерывают до достижения терминального состояния, то до 70% животных выживает, однако нарушения метаболизма продолжают и нормализация наступает только через 30—45 дней [5].

Развитие кислородной интоксикации сопровождается нарушением функций всех типов биологических мембран: изменением проницаемости мембран эритроцитов и лизосом [6, 7], изменением активности Na^+ , $-\text{K}^+$ -АТФазы, моноаминоксидазы [8, 18] и др. В то же время не изучено, какие модификации структурных компонентов мембран ответственны за изменение их функций при ГБО.

В данной работе представлены материалы по фракционному составу и обмениваемости белков мембран субклеточных фракций больших полушарий головного мозга крыс. Изучали действие ГБО 0,3 МПа в течение 2 ч (общетоксическая форма кислородной интоксикации) и ГБО 0,7 МПа до наступления судорог.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах массой 120—140 г. При исследовании обмениваемости белков мембран животным вводили внутривенно D-L- ^{14}C -лейцин до помещения в барокамеру. Исследовали животных в состоянии судорожного приступа, вызванного действием 0,7 МПа кислорода (среднее время 30 ± 10 мин) (1); находящихся в условиях нормоксии спустя 2 ч после судорожного приступа (2) и подвергавшихся действию 0,3 МПа кислорода в течение 2 ч (3). Контроль подопытной группой. Первой группе—за 60 мин до помещения в барокамеру, второй и третьей—непосредственно перед компрессией.

Субклеточные фракции ткани мозга получали методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы [9]. Полученные фракции подвергали гипосмотическому шоку в 0,001 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0 и трижды отмывали в том же буфере при 100000 g в течение 20 мин. Часть полученного материала осаждали в виде додецилсульфата натрия [10]. Электрофореграммы денситометрировали на денситометрической приставке к спектрофотометру, видящей область спектра «Spectol» (ГДР). На электрофореграммах подсчитывали число фракций и определяли величины их молекулярных масс по стандартной кривой, полученной с помощью белков с известными молекулярными массами. Денситограммы разделяли на зоны, соответствующие определенным значениям M, и определяли относительное содержание белка в зонах гравиметрическим методом.

Для определения включения ^{14}C -лейцина в белки мембран из препаратов мембран органическими растворителями удаляли липиды мажних фильтрах в толуольном сцинтиляторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике СБС-2. Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту-Фишеру.

Результаты и обсуждение

Полученные нами данные включения ^{14}C -лейцина в белки мембран субклеточных фракций мозга интактных животных соответствуют данным литературы. Максимум включения ^{14}C -лейцина приходится на мембраны микросом; мембраны митохондрий и синапсом занимают промежуточное положение, и наиболее низким включением характеризуется миелин [12, 13].

Таблица 1
Включение ^{14}C -лейцина в белки мембран субклеточных фракций мозга крыс при разных режимах ГБО (в % к контролю)

Режим ГБО	Миелин	Микросомы	Митохондрии	Синапсомы
Контроль 0,7 МПа	100% 100% n=6	100% 94,7% n=8 $p > 0,05$	100% 100% n=8	100% 74,5% n=7 $p < 0,05$
0,7 МПа +2 ч	77,6% n=14 $p < 0,01$	100% n=14	100% n=15	87,7% n=15 $p < 0,05$
0,3 МПа/2 ч	122,7% n=6 $p < 0,05$	145,7% n=13 $p < 0,001$	130,6% n=18 $p < 0,001$	127,3% n=13 $p < 0,001$

Действие на животных 0,7 МПа кислорода вызывает снижение включения ^{14}C -лейцина в белки мембран синапсом (табл. 1), что является, по-видимому, следствием резкого нарушения метаболизма мембран нервных окончаний при судорогах, вызванных ГБО. Ингибирование включения радиоактивных аминокислот в белки синапсом характерно и для судорожных приступов, вызванных электрошоком [14]. Через 2 ч после действия 0,7 МПа кислорода включение ^{14}C -лейцина в мембраны синапсом приближается к уровню контроля, но остается ниже на 12,3%. Включение ^{14}C -лейцина в мембраны миелина уменьшается на 22,4% только через 2 ч после действия 0,7 МПа. В то же время включение метки в мембраны микросом и митохондрий остается практически без изменений в состоянии судорог и через 2 ч после них. Приближение включения ^{14}C -лейцина в мембраны синапсом к контрольному уровню через 2 ч после судорог свидетельствует о тенденции к нормализации процесса нарушения обмена белков, тогда как в мембранах миелина изменения белкового компонента нарастают. Такой характер нарушения метаболизма белков мембран различных субфракций ткани мозга при действии высоких давлений кислорода связан, по-видимому, с различной структурной и функциональной организацией мембран миелина, синапсом, микросом и митохондрий.

С целью выявления возможных структурных нарушений в мембранах при действии 0,7 МПа кислорода мы провели диск-электрофорез белков мембран субклеточных фракций в присутствии додецилсульфата натрия. Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о значи-

тельном (почти в три раза) снижении относительного содержания белков мембран синапсом с М от 12 до 17 кД и некотором увеличении содержания белков с М от 25 до 84 кД. В мембранах других субклеточных фракций статистически достоверных изменений не обнаружено. Причиной нарушений могут быть межмолекулярные сшивки белков мембран продуктами перекисного окисления липидов в мембранах, интенсивность которого значительно возрастает при ГБО. Эти результаты указывают на достаточно глубокие нарушения в составе белков мембран синапсом, что, в свою очередь, не может не отразиться на их функциях.

Таблица 2

Содержание белков с различной величиной М (в % к сумме) в мембранах субклеточных фракций мозга крыс при действии 0,7 МПа кислорода

Зоны	1	2	3	4	5
М	280— 84 кД	84— 40 кД	40— 25 кД	25— 17 кД	17— 12 кД
	М и е л и н				
Контроль	7,63	12,74	20,87	24,55	34,21
Опыт	5,18	14,77	25,99	21,74	32,32
	М и к р о с о м ы				
Контроль	13,70	25,60	28,49	22,04	10,16
Опыт	12,45	25,74	31,62	22,61	7,10
	М и т о х о н д р и и				
Контроль	14,48	27,03	25,20	20,65	12,64
Опыт	10,79	25,09	26,64	23,79	13,68
	С и н а п т о с о м ы				
Контроль	9,72	18,97	25,60	24,96	20,83
Опыт	10,80	25,89	31,86	24,11	7,84
		p<0,05	p<0,01		p<0,001

Данные исследований по включению меченых аминокислот в белки разных тканей и органов при низких давлениях кислорода противоречивы: так у Choу и сотр. [15] давление в 0,1—0,3 МПа кислорода усиливает включение ³Н-лейцина в белки мозга печени и плазмы крови. Однако, по данным Ford и сотр. [16] и Гершеновича и Кричевской [17], низкие давления стимулируют включение радиоактивных аминокислот в белки мозга, печени и почек. В опытах при действии на животных 0,3 МПа кислорода в течение 2 ч (табл. 1) мы наблюдали значительное увеличение включения радиоактивной метки в белки мембран субклеточных фракций мозга. Максимальное увеличение включения ¹⁴С-лейцина установлено для мембран микросом, минимальное—для мембран миеллина. Ингибирование включения метки в острой форме кислородной интоксикации связано с многосторонними нарушениями метаболизма: усилением процессов перекисного окисления липидов мозга, нарушением проницаемости мембран и активацией процессов

протеолиза, модификацией активности ряда ферментов [3]. Установлено, например, что во время судорожного приступа активность Na^+ , K^+ -АТФазы снижается на 50%, а при низких давлениях ее активность возрастает на 34% [18].

Полученные результаты свидетельствуют в пользу концепции о разной направленности реакции организма на высокие и относительно низкие концентрации кислорода, превышающие нормальную. Это может быть одним из обоснований использования низких давлений кислорода в медицинской практике.

INCORPORATION OF ^{14}C -LEUCINE INTO RAT BRAIN MEMBRANE PROTEINS AT DIFFERENT REGIMES OF HYPERBAROXYGENATION

SHERSTNEV K. B., SULEIMANOV A. K., KRICHNEVSKAYA A. A.
Rostov-on-Don State University, Institute of Biology Rostov-on-Don

It has been found that incorporation of ^{14}C -leucine into synaptosomes' membrane proteins is inhibited at the acute stage of oxygen intoxication and accompanied by a sharp depletion of proteins with M 12—17 kDa in synaptosomal membranes. The application of low pressure oxygen increases the incorporation of ^{14}C -leucine into the subcellular fractions' membranes. These data point to the usefulness of low pressure oxygen in medicine.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Броницкая Э. Г. Биохимические механизмы кислородной интоксикации. Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, с. 11—18, 1980.
2. Ефунд С. Н.—В кн.: Тез. VII Международного конгресса по гипербарической медицине, М., с. 210, 1981.
3. Зальцман Г. Л., Кучук Г. А., Гургенидзе А. Г. Основы гипербарической физиологии, Л., Медицина, с. 319, 1979.
4. Жиронкин А. Г. Кислород. Физиологическое и токсическое действие, Л., Наука, с. 172, 1972.
5. Эмирбекова А. А. Космич. биол. и авиакосмич. мед., 12, 2, 86—88, 1978.
6. Лукаш А. И., Внуков В. В., Шерстнева Н. Я. Космич. биол. и авиакосмич. мед., 2, 47—51, 1979.
7. Лукаш А. И., Чихачев А. С., Карташева Л. Д. Укр. биохим. ж., 47, 728—733, 1975.
8. Горошинская И. А., Броницкая Э. Г. Вопросы мед. химии, 22, 621—625, 1976.
9. Gray C. G., Whittaker V. B. J. of Anatomy, 96, 79—88, 1962.
10. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406—4412, 1969.
11. Wherrett J. R., Towser D. B. J. Neurochem., 18, 1027—1042, 1971.
12. Паладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. Белки головного мозга и их обмен. Киев, Наукова думка, с. 316, 1979.
13. Rodrigenz G., Alberici M., De Robertis E. Brain Res., 31, 179—184, 1971.
14. Vesco C., Gluditta A. J. Neurochem., 15, 81—85, 1968.
15. Chou O. G., Ford D. H., Rhines R. K. Acta neurol. scand., 48, 3, 359—330, 1972.
16. Ford D. H., Rhines R. K. J. Neurol. Sci., 19, 4, 483—490, 1973.
17. Гершенович Э. С., Кричевская А. А. ДАН СССР, 103, 449—451, 1956.
18. Шерстнева Н. Я., Броницкая Э. Г. Укр. биохим. ж., 48, 417—420, 1976.

Кафедра биохимии и биотехнологии РГУ,
НИИ биологии, Ростов-на-Дону

Поступила 5. X 1982