



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИИ

УДК 577.121.7

ОБ УРОВНЯХ ФОСФОРСОДЕРЖАЩИХ МЕТАБОЛИТОВ
В МОЗГУ КРЫС ПО ДАННЫМ ^{31}P -ЯМР

ЛИХОДИН С. СТ., СЕМЕНОВА Н. А., ДУБИНСКИЙ В. З.

*ЛИХОДИН С. С., СИБЕЛЬДИНА А. А.

Институт химической физики, Москва;

*Целиноградский государственный медицинский институт

В настоящей работе методом ^{31}P -ЯМР высокого разрешения *in vitro* и *in vivo* проведено сравнение уровней фосфорсодержащих метаболитов в мозгу крыс при нормотермии и гипотермии.

Использовали беспородных крыс-самцов массой 120—150 г. Температуру тела снижали, вводя животным внутривенно аминазин в дозе 50 мг/кг под легким эфирным наркозом и помещая их в бокс с температурой 0°. Через 2—3 ч, когда ректальная температура снижалась до 15—20°, мозг извлекали из черепной коробки и помещали в охлажденный до 0° физиологический раствор. С момента вскрытия черепной коробки до помещения мозга в физиологический раствор проходило не более 10 с. У контрольных животных мозг извлекали под эфирным наркозом. Спектры ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре WH-360 с рабочей частотой 145, 78 МГц для ядер фосфора. Использовались 60°-ный импульс и релаксационная задержка 0,45 с. Для получения спектра производили 2000 накоплений. Для количественных измерений спектры снимались с задержкой 10 с, с тем, чтобы исключить насыщение сигналов. Концентрации метаболитов по спектрам ЯМР определяли с помощью калиброванного внешнего стандарта. Спектры ^{31}P -ЯМР мозга *in vivo* были получены на ЯМР-спектрометре AM-400 (162 МГц для ядер фосфора) с помощью специально изготовленного датчика с поверхностной катушкой. Задержка на релаксацию в этих экспериментах равна 3 с, длительность зондирующего импульса 30 мкс.

На рис. 1 представлены типичные спектры ^{31}P -ЯМР изолированно-то мозга контрольного животного (а) и животного с ректальной температурой 15° (б). Видно, что спектры практически тождественны. Из приведенных в таблице относительных интенсивностей сигналов, усредненных по нескольким опытам, также следует, что снижение температуры тела не приводит к заметному изменению уровней фосфорсодержа-

ших соединений в мозгу. Полученные нами значения концентраций фосфорсодержащих метаболитов в основном хорошо согласуются с наиболее достоверными результатами биохимических исследований, а именно, с такими, в которых приведены наибольшие концентрации лабильных креатинфосфата и АТР [1]. При биохимических исследованиях метаболизма мозга крыс в условиях гипотермии было показано [2], что при температурах до 20° уровни макроэргов и P_i увеличиваются по сравнению с нормой на 5—10%, что также хорошо согласуется с нашими данными

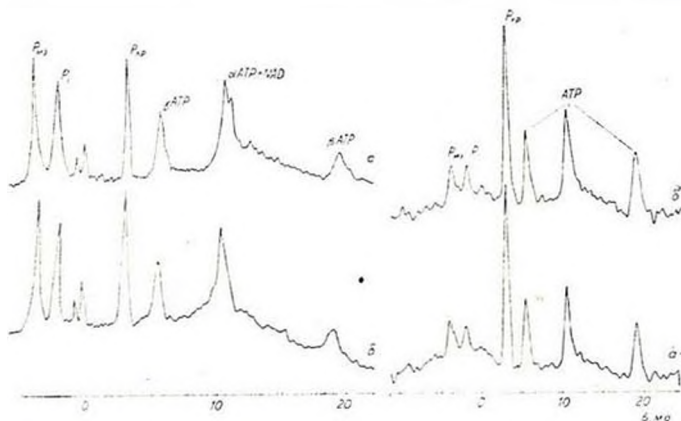


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР изолированного мозга контрольного животного (а) и животного при гипотермии 15° (б). P_m — фосфомоноэфиры. P_k — креатинфосфат, P_i — неорганический фосфат

Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР мозга крыс *in vivo* при нормотермии (а) и при гипотермии 15° (б). Химические сдвиги определены относительно креатинфосфата, для которого принято $\delta = 3,0$ м. д. Обозначения те же, что и на рис. 1

(таблица). Вместе с тем возникает вопрос, не может ли эффект гипотермии маскироваться амплитудными изменениями уровней фосфорных метаболитов, происходящими при выделении мозга? Чтобы ответить на него, мы получили ^{31}P -ЯМР спектры мозга крысы *in vivo* с помощью поверхностной катушки. На рис. 2 представлены типичные спектры, полученные для контрольного животного (а) и животного с ректальной температурой 15° (б). Видно, что спектры *in vivo* и *in vitro* действительно заметно различаются, а в опытах *in vivo* эффект гипотермии не наблюдается.

Обращает на себя внимание аномально высокий уровень фосфомоноэфиров (3—5 м. д. по шкале химических сдвигов) в спектрах *in vitro*. Методика измерений *in vivo* не позволяет получить из спектров значения концентраций метаболитов в абсолютных единицах. Оценки, сделанные на основании относительных интенсивностей сигналов ЯМР, показывают, что в спектрах *in vivo* величина сигналов в области моно-

Интенсивности сигналов ^{31}P -ЯМР фосфорных метаболитов, приведенные к интенсивности сигнала P_i и абсолютные концентрации фосфорных метаболитов (ммоль/г) ($n=5$)

	Неорганический фосфат (P_i)		Фосфомоноэфиры		Креатинфосфат		АТФ	
	отн.	абс.	отн.	абс.	отн.	абс.	отн.	абс.
Контроль	100	—	95 ± 18	8.45 ± 1.60	67.0 ± 4.7	2.70 ± 0.19	23 ± 2	2.10 ± 0.13
Опыт	100	—	103.0 ± 4.1	—	76.0 ± 5.0	—	24.0 ± 5.0	—

эфиров достаточно хорошо согласуется с определенной биохимически суммарной концентрацией фосфатов сахаров и АМР. Полученные же из спектров *in vitro* концентрации фосфомоноэфиров на порядок превышают эти значения, но хорошо согласуются с результатами, полученными на срезах мозга [3]. Причина этих различий неясна. Возможно, сама процедура отделения мозга уже сопровождается процессами, приводящими к увеличению концентрации регистрируемых методом ^{31}P -ЯМР фосфомоноэфиров.

STUDY OF THE PHOSPHOROUS CONTAINING METABOLITE LEVELS IN THE RAT'S BRAIN BY MEANS OF ^{31}P -NMR

LIKHODY S. St., SEMIONOVA N. A., DUBINSKY W. Z., *LIKHODY St. S.,
SIBELDINA L. A.

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
*Tselinograd Medical school

The levels of phosphorous containing metabolites of the rat's brain during hypothermia are evaluated by ^{31}P -NMR *in vivo* and *in vitro*. It is shown that the reducing of the rat's body temperature from normal to 15°C does not cause any changes in ATP and phosphocreatine content. It is found that the content of the phosphomonoesters in an isolated rat brain is about ten times higher than in the intact brain of a living rat.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kopp S. J., Kriegstein J., Freidank A., Kachman A., Scilert A., Cohen M. M. J. *Neurochem.*, v. 43, p. 1716, 1984.
2. Эмирбеков Э. Э., Львова С. П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. Ростов-на-Дону. Изд-во РГУ, 1985.
3. Cox O. W. C., Morris P. G., Feeney S., Sachelard H. S. *Biochem. J.*, v. 212, p. 365, 1983.

Поступила 8. IV 1987