

Г. Е. ВЛАДИМИРОВ и Л. Н. РУБЕЛЬ

О СКОРОСТИ ОБНОВЛЕНИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ И ФОСФОКРЕАТИНА В МОЗГУ КРЫС

(Представлено академиком К. М. Быковым 16 IV 1954)

Важная роль богатых энергией фосфорных соединений в обмене мозга в последние годы все больше и больше привлекала внимание исследователей (¹⁻⁵). Однако лишь немногие работы посвящены изучению скорости обмена фосфорных остатков в составе АТФ и фосфокреатина при помощи меченых атомов и иногда (⁶) без надлежащего критического рассмотрения полученных в опыте величин, в частности, без учета факта медленного проникновения меченой фосфорной кислоты из крови в ткань мозга (^{7, 8}).

Задача настоящего исследования заключалась в выяснении того, в какой мере получаемые в опытах результаты отражают размеры истинного обновления лабильного фосфора АТФ и фосфокреатина.

В первой серии опытов белым крысам весом в 170—200 г вводился подкожно препарат меченого фосфата натрия из расчета 50 μ г фосфора с радиоактивностью 0,1—0,2 μ к на 1 г веса тела. Через 30—60 мин животное замораживалось погружением в жидкий кислород. Замороженные большие полушария головного мозга извлекались, растирались в тонкий порошок, который экстрагировался 10 мл 4% трихлоруксусной кислоты. Неорганический фосфор выделялся магнизиально-кальциевой смесью в аммиачной среде по Делори (⁹). Остающийся в отстое фосфокреатин гидролизовался соляной кислотой (40 мин. при 37°), и отщепляющийся ортофосфат осаждался тем же способом. Из другой порции безбелкового фильтрата выделялась АТФ в виде ее ртутной соли. В части ее определялся неорганический фосфор, захватываемый ртутным осадком АТФ. В другой порции отщеплялся лабильный фосфат АТФ 10-минутным гидролизом 1N HCl при 100°, и неорганическая фосфорная кислота осаждалась по Делори. Выделенные фосфорные фракции исследовались на содержание общего фосфора (по Фиске — Суббароу) и на содержание радиоактивного фосфора (при помощи счетной установки Б).

По методу Делори, наряду с наиболее полным осаждением неорганического фосфора, что является необходимым условием для правильного определения активности фосфора фосфокреатина, в осадок увлекается незначительное количество кальциевой соли АТФ. Поэтому для определения истинной удельной активности неорганических фосфатов мозга в третьей порции трихлоруксусного фильтрата проводилось осаждение обычной магнизиальной смесью. Сопоставление полученных данных позволяло внести необходимые поправки при расчете удельных активностей АТФ и фосфокреатина.

Результаты проведенных опытов приведены в табл. 1.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, казалось бы, медленный обмен лабильных фосфатных групп в АТФ и фосфокреатине. Даже за

1 час замена имевшихся ранее фосфорных группировок на меченые произошла менее чем наполовину (33—46%). У животных, находившихся в состоянии возбуждения вследствие раздражения их лапок электрическим током, размеры вхождения радиоактивного фосфора оказались такими же, как и у животных, находившихся в состоянии относительного покоя.

Между тем имеется много оснований считать, что обновление лабильного фосфора АТФ и фосфокреатина происходит очень быстро. В пользу этого свидетельствует то, что эти соединения при нарушении физиологических условий быстро распадаются (см. табл. 2).

Таблица 1

Относительная удельная активность (О. У. А.) АТФ и фосфокреатина в мозгу крыс

Состояние животного	Про. олжит. опыта в мин.	Число опытов	Уд. активн. неорг. Р (на 1 мг)	О. У. А. АТФ (средн.) в %	О. У. А. фос-фокреатина в %
Покой	30	6	23000—34600***	18	19
"	60*	12	8400—14500	33	34
"	60**	5	6300—10500	44	46
"	120	4	4700—10600	59	61
Повт. раз-дражение лапок элек-трич. током	30	7	14200—34300***	20	21
"	60*	2	8100—9000	38	38
"	60**	5	7200—10800	46	46

* Опыты проведены весной.

** Опыты проведены зимой.

*** Вводилось 0,2 μ к на 1 г веса тела.

крови, которая резко повышает радиоактивность исследуемого в опыте неорганического фосфора. Поэтому при вычислении относительной удельной активности лабильного фосфора АТФ берется завышенная величина удельной активности неорганического фосфата.

Очевидно, более правильное отражение скорости внедрения радиоактивного фосфора в АТФ можно получить, вводя меченый фосфат непосредственно под паутинную оболочку мозга, минуя кровеносную систему. Для этого мы производили крысам при неглубоком эфирном наркозе субарахноидальное введение 0,1 мл раствора фосфата с содержанием 10,0 μ к радиоактивного фосфата. При правильном уколе у животных через 3—5 мин. восстанавливались движения и нормальное поведение. Через 20 мин. крысы замораживались погружением в жидкий кислород. Величина относительной удельной активности АТФ при этом составляла от 46 до 71%, т. е. содержание радиоактивного фосфата было значительно больше, чем

Таблица 2

Содержание АТФ и фосфокреатина в мозгу крыс при различных способах замораживания мозга

Способ замораживания	Неорганич. фосфор в мг %	Лабильный фосфор АТФ в мг %	Фосфор фос-фокреатина в мг %
Погружение целого животного в жидкий кислород	12,6	17,8	9,3
Обезглавливание с замораживанием головы через 3 сек.	22,6	5,7	3,4
То же, но с замораживанием через 30 сек.	23,9	—	1,4
То же, но с замораживанием через 45 сек.	31,7	2,7	0,0

при введении его препарата под кожу. Близкие результаты были получены также Линдбергом и Эрнстером ⁽¹³⁾. Однако и эта величина является несомненно заниженной, так как диффузия фосфата из субарахноидального пространства в глубину ткани мозга не происходит мгновенно.

Наконец, проведенные нами опыты с тканевыми срезами мозга в солевой среде, содержащей сахар (по Мак-Ильвен и др. ⁽¹⁴⁾), также дают результаты, свидетельствующие о более быстром обновлении лабильного фосфора АТФ, чем это вытекало из данных табл. 1.

Все эти данные и соображения побудили нас ⁽¹⁵⁾ высказать положение, что по содержанию меченого фосфора в составе лабильных фосфатных группировок АТФ можно судить о содержании меченого фосфора во внутриклеточных неорганических фосфатах ткани мозга.

Для дальнейшего доказательства этого положения были произведены опыты, в которых можно было рассчитать количество крови в мозгу и сделать поправки на ее фосфорные соединения.

О содержании крови в ткани мозга судили по количеству находимого в ней железа. Железо определялось о-фенантролиновым методом ⁽¹⁶⁾ после сжигания ткани по Нейману. В крови крыс содержание железа в среднем было найдено равным 480 μ г железа на 1 г крови.

В ткани мозга, отмытой от крови (5 опытов), количество железа составляло 11,4—14,7 μ г на 1 г (среднее 12,5 μ г). После обезглавливания и обсушивания извлеченного мозга фильтровальной бумагой (6 опытов) было определено 16,5—20,6 μ г на 1 г ткани (среднее 18,9 μ г). При замораживании крысы целиком (15 опытов) в ткани мозга было найдено 35,0—57,5 μ г железа на 1 г ткани (среднее 43,6 μ г); при замораживании же только что отсеченной головы количество железа несколько снижалось и составляло в среднем 33,0 μ г.

Если исходить из средних цифр, то в ткани мозга крыс, обезглавливаемых без замораживания, остается 1,3% крови по отношению к весу ткани мозга, при замораживании животного целиком 6,4%, при замораживании же отсеченной головы 4,3%.

Приведем образец расчета, позволяющего определить удельную активность фосфорных соединений в ткани мозга, свободной от крови; воспользуемся для этого цифрами одного из опытов (см. табл. 3).

Таблица 3

Соотношение удельных активностей (на 1 мг фосфора) неорганического фосфора и АТФ крови и мозга белых крыс через 1 час после введения меченого фосфора

К р о в ь				М о з г			
Неорган. фосфор		Лаб. фосф. АТФ		Неорган. фосфор		Лаб. фосф. АТФ	
уд. активн.	содерж. в мг %	уд. активн.	содерж. в мг %	уд. активн.	содерж. в мг %	уд. активн.	содерж. в мг %
125240	6,2	55330	3,1	6637	9,9	2697	14,0

1) Активность АТФ, обнаруженная в ткани мозга аналитически (рассчитано на 100 г ткани мозга): $2697 \cdot 14,0 = 37758$.

2) Активность АТФ, зависящая от присутствующей в ткани мозга крови, исходя из содержания крови 6,4%: $55330 \cdot 3,1 \cdot 0,064 = 10977$.

3) Активность, зависящая от АТФ, свободной от крови ткани мозга (искомая удельная активность = x):

$$x(14,0 - 3,1 \cdot 0,064) \cdot 0,936 = 12,92x.$$

Так как (1) = (2) + (3), то

$$x = \frac{37758 - 10977}{12,92} = 2072.$$

Такой же расчет для активности неорганического фосфора:
 1) $6637 \cdot 9,9 = 65706$; 2) $125240 \cdot 6,2 \cdot 0,064 = 49695$; 3) $x \cdot (9,9 - 6,2 \cdot 0,064) \cdot 0,936 = 8,89x$; $x = 1801$.

Таким образом, удельная активность лабильного фосфора АТФ оказалась в пределах возможных погрешностей исследования такой же, как и удельная активность неорганического фосфора.

Этот же расчет показывает, что в одночасовых опытах удельная активность неорганических фосфатов в ткани мозга, свободной от крови, ниже таковой для них же в крови не в 20, как можно было бы заключить

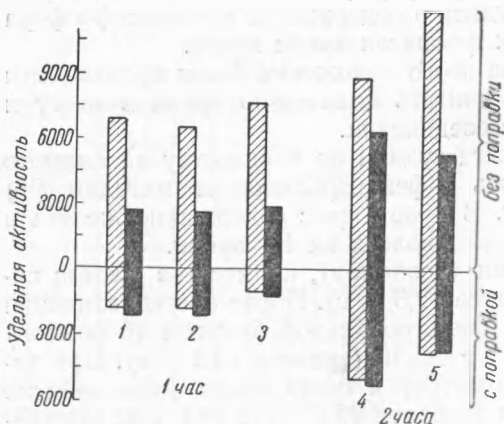


Рис. 1. Влияние примеси крови на удельную активность неорганического фосфора (заштриховано) и лабильного фосфора АТФ (зачернено) мозга. 1—4—задержка крови 6—6,4%, 5—8% от веса ткани мозга

по табл. 3, а примерно в 70 раз. Отсюда становится ясным, какая большая ошибка в расчетах связана с загрязнением мозговой ткани кровью.

На рис. 1 приведены данные непосредственных анализов (кверху от оси абсцисс) и результаты расчетов с поправкой на искажение, обусловленное примесью крови (книзу от оси абсцисс) для отдельных опытов. Из рис. 1 видно, что даже через 2 часа погрешность, обусловленная примесью крови, еще значительна, хотя вследствие большего проникновения меченого фосфата в ткань мозга она становится меньше.

Быстрое обновление АТФ в ткани мозга исключает возможность по полученным вели-

чинам относительной удельной активности судить о размерах ее обновления. Обнаруживаемые через 30 мин. и позднее низкие величины относительной удельной активности не отражают истинного обновления АТФ. За эти сроки АТФ успевает обновиться много раз. Поэтому имеет ли место ускорение обновления АТФ или нет, величина удельной активности лабильного фосфора АТФ будет одной и той же. Таким образом, становится ясным и то, что в условиях возбуждения центральной нервной системы не удастся обнаружить изменений удельной активности лабильного фосфора АТФ. Так как вовлечение радиоактивного фосфора в фосфокреатин происходит в таких же размерах, как и в состав лабильных фосфорных групп АТФ, то соображения, высказанные в отношении АТФ, в полной мере справедливы и для фосфокреатина.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
 Академии наук СССР

Поступило
 6 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. А. Владимирова, Физиол. журн. СССР, **25**, 930 (1938).
- ² П. Ф. Ми-
наев, Т. П. Курохтина, Укр. биох. журн., **21**, 359 (1949).
- ³ М. И. Левянт,
И. Г. Малкиман, Б. И. Каменецкая, Укр. биох. журн., **21**, 363 (1949).
- ⁴ К. Г. Громова, В. С. Шапот, ДАН, **78**, 941 (1951).
- ⁵ К. Г. Громова,
Т. Е. Кудрицкая, И. Р. Петров, В. С. Шапот, Биохимия, **17**, 13 (1952).
- ⁶ А. В. Палладин, А. А. Рыбина, ДАН, **91**, 903 (1953).
- ⁷ Г. Е. Владими-
ров, Тр. ВМА им. С. М. Кирова, **1**, 205 (1946).
- ⁸ Г. Хевеши, Радиоактивные
индикаторы, ИЛ, 1950.
- ⁹ G. E. Delory, Biochem. J., **32**, 1161 (1938).
- ¹⁰ H. A. Krebs, Biochim. et Biophys. Acta, **4**, 249 (1950).
- ¹¹ H. E. Himwich,
Brain Metabolism and Cerebral Disorders, Baltimore, 1951.
- ¹² S. Ochoa, J. Biol.
Chem., **155**, 87 (1944).
- ¹³ O. Lindberg, L. Ernster, Biochem. J., **46**, 43 (1950).
- ¹⁴ H. McIlwain, L. Buchel, I. D. Cheshire, ibid., **48**, 12 (1951).
- ¹⁵ Г. Е. Владимиров, Физиол. журн. СССР, **39**, 3 (1953).
- ¹⁶ Е. Б. Сендел,
Колориметрическое определение следов металлов, 1949.