Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 2

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР Е. М. КРЕПС и Е. Ю. ЧЕНЫКАЕВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИПОКСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ В КЛЕТКАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС МЕТОДОМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В настоящее время общепринятым является представление, что окислительный обмен является основным в обеспечении энергетических затрат центральной нервной системы. Многочисленными работами установлено, что при нарушении нормального течения окислительных процессов в головном мозгу происходят резкие изменения в функции центральной нервной системы. Отсюда понятен тот интерес, который проявляется к изучению обменных процессов в мозговой ткани при различных формах и степенях гипоксии.

Доказано, что ресинтез макроэргических фосфорных соединений в мозгу значительно угнетается при гипоксии, вызванной нарушением нормального кровоснабжения головного мозга ([1,2]). В опытах in vitro ([3–5]) получен ряд убедительных данных, указывающих на зависимость обмена нуклеопротеидов, фосфопротеинов и фосфолипидов в срезах мозга от содержания кислорода в окружающей среде. В анаэробных условиях или в условиях угнетения окислительных ферментов наблюдается резкое снижение включения радиоактивного фосфора во все указанные соединения.

Однако исследования скорости обмена этих соединений в мозгу на целом организме показали, что при кислородном голодании мозга, вызванном пребыванием животных в разреженной атмосфере, скорость обмена фосфорных соединений в мозге ([6]) или вовсе не изменяется, или снижается только скорость обмена фосфолипидов. Скорость обновления фосфора во фракции РНК при этом не изменяется ([7]).

Более отчетливое снижение в обмене фосфорных соединений наблюдается в мозге у животных при ишемии мозга, но и в этих условиях наименьшие изменения отмечаются во фракции РНК.

Следует заметить, что биохимическое исследование растертой, разрушенной ткани, где в химическое определение идет вся масса нервной ткани (клетки, проводники, глия, сосуды и т. д.), не может отразить истинной картины изменения обменных процессов в отдельных элементах ткани, а дает лишь суммарную картину. Вместе с тем известно, что сложности и разнообразному строению клеток отвечает большая неоднородность как химического состава, так и скорости химических процессов в различных группах клеток и в различных структурных образованиях клетки. С этой точки зрения такое тотальное биохимическое исследование, даже с применением прижизненного метода радиоактивных изотопов, не является достаточным при решении вопросов функциональной биохимии, задачу которой составляет изучение связи химизма, структуры и функции. Отсутствие четких изменений при биохимическом исследовании разрушенной ткани не исключает возможности получения других результатов при изучении химических процессов методами гисто- и цитохимии, дающими возможность изучать химические процессы в индивидуальных нервных клетках.

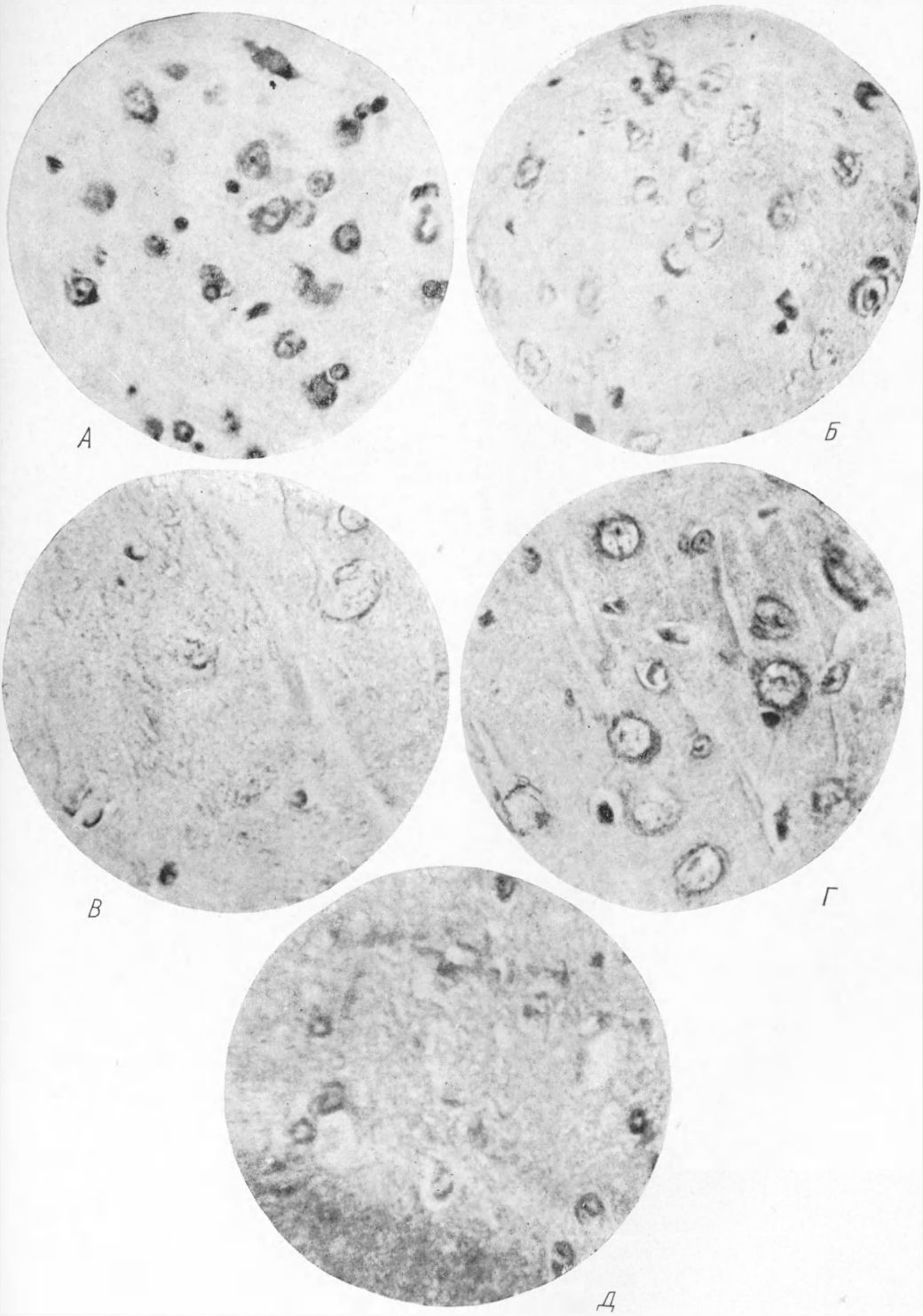


Рис. 2. Микрофотографии срезов коры мозга, сделанные в у.-ф. микроскопе. *А* — III слой коры контрольной крысы; *Б* — III слой коры «гипоксической» крысы (2 ч. 9500 м); *В* — V слой коры «гипоксической» крысы (2 ч. 9500 м); *Г* — V слой коры «гипоксической» крысы (5 мин. 14000 м); *Д* — III слой коры контрольной крысы после обработки среза рибонуклеазой

Работами ряда авторов ([8—13]) с применением метода ультрафиолетовой микроскопии показаны значительные изменения в содержании нуклеиновых кислот в цитоплазме нервных клеток при различных воздействиях, изменяющих функциональное состояние соответствующих отделов центральной нервной системы. Отсюда вытекает интерес к гистохимическому изучению влияния гипоксии на нуклеиновые кислоты в клетках головного мозга.

В настоящей работе для гистохимического исследования было использовано свойство нуклеиновых кислот поглощать у.-ф. лучи при длине волны 265 мμ. Ультрафиолетовая микроскопия срезов мозга проводилась под руководством Е. А. Моисеева. Опыты ставились на крысах в тех же условиях гипоксического режима, которые применялись в лаборатории для биохимического изучения влияния гипоксии на обмен нуклеопротеидов в мозге ([7]). Гипоксия создавалась в небольшой барокамере влиянием разреженной атмосферы. Исследовались две формы гипоксии: 1) очень высокая степень гипоксии, но действующая всего несколько минут — подъем в течение 5—6 мин. на условную высоту около 14 000 м (100 мм рт. ст.); 2) умеренная гипоксия, но действующая более длительное время — 2-часовое пребывание на условной высоте 9500 м (240 мм рт. ст.). Во время опыта регистрировались частота дыхания и поведение животных. Животные убивались обезглавливанием.

В опытах I серии, как только наступало редкое дыхание, обычно предшествующее полной остановке дыхания, давление в камере быстро (в течение 5 сек.) доводилось до атмосферного, крысу вынимали из камеры и убивали. Во II серии животные обезглавливались после окончания срока экспозиции. Полушария мозга извлекались, и кусочки мозга толщиной в 2—3 мм фиксировались в охлажденном 96° спирте и заливались в парафин.

Для микроскопического исследования готовились срезы толщиною в 2 μ. Поглощение у.ф. лучей исследовалось в у.-ф. микроскопе МУФ-1 с фильтром, дающим возможность производить исследования при длине волны 257—280 мμ. Микрофотографированию подвергались различные слои коры больших полушарий мозга в теменной области и Аммонов рог. Клетки Аммонова рога при гипоксии мозга и при анемии обнаруживают столь же резкие изменения в морфологической картине, как и клетки коры мозга ([14]). Параллельно с мозгом «гипоксических» крыс изучался мозг животных в норме (контроль). Срезы, соседние с исследовавшимися в у.-ф. микроскопе, окрашивались толуидиновой синью по Нисслю. Клетки на негативах микрофотографий фотометрировались в микрофотометре МФ-1. Определялся процент пропускания света различными структурными образованиями клетки, указывающий на поглощение ими у.-ф. лучей. В каждом слое подвергались фотометрии 20—30 клеток, т. е. делалось около 250 промеров.

На рис. 1 изображены результаты фотометрии различных клеток мозга контрольных и «гипоксических» крыс. Каждый столбик представляет средние из 8 опытов.

Результаты. Поглощение у.-ф. лучей клетками коры мозга теменной области и клетками Аммонова рога у крыс в норме значительно, но неоднородно. Наблюдается мозаичность, обусловленная различием величины поглощения от клетки к клетке, в средних величинах все же дающая достаточно высокое поглощение. В самой клетке более высоким поглощением обладает цитоплазма и ядрышко и значительно меньшим — ядро. У крыс, находящихся в состоянии острой гипоксии, поглощение у.-ф. лучей в клетках коры мозга и в клетках Аммонова рога значительно снижено. Поглощение особенно падает в цитоплазме и ядрышке и меньше в ядре.

Гипоксия более длительная, но относительно умеренная (2 часа на высоте 9500 м) дает более выраженное снижение поглощения, тогда как

очень высокая степень гипоксии, но действующая на протяжении всего нескольких минут, почти приводящая к гибели животных, вызывает менее выраженное снижение поглощения у.-ф. лучей (см. рис. 1 и микрофотографии рис. 2). Особенно много клеток с резко уменьшившимся поглощением встречается в V слое коры. Многие клетки здесь отличаются

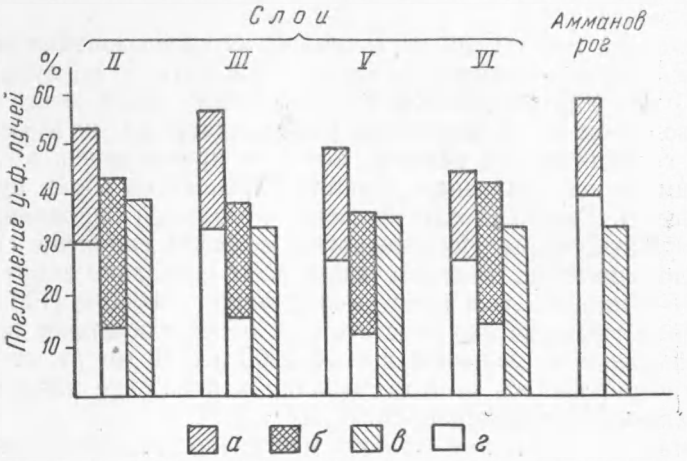


Рис. 1. Поглощение у.-ф. лучей цитоплазмой клеток различных слоев коры больших полушарий и Аммонова рога. Срезы мозга: *а* — контрольных крыс; *б* — «гипоксических» крыс (5 мин. 14000м); *в* — «гипоксических» крыс (2 часа 9500 м); *г* — после обработки среза рибонуклеазой

настолько малым поглощением, что имеет вид «теней». В таких клетках ядра не контурированы и клетки с трудом отличаются от фона (рис. 2, *В*).

На окрашенных по Нисслю препаратах в клетках, соответствующих слабо поглощающим и «теням», наблюдается ряд изменений — хроматолиз тигроида, вакуолизации ядер, в некоторых опытах гиперхромность ядер. В у.-ф. микроскопе такие гиперхромные ядра не только не отличаются усиленным поглощением, а наоборот, показывают заметное снижение поглощения у.-ф. лучей. В ряде опытов срезы мозга контрольных и «гипоксических» крыс подвергались обработке рибонуклеазой, расщепляющей рибонуклеопротеид. Такая обработка приводила к уменьшению поглощения в нервных клетках на 20—25% как в контрольных, так и в «гипоксических» опытах (рис. 1, *г* и рис. 2, *Д*). Это может служить косвенным аргументом в пользу того, что уменьшение поглощения у.-ф. лучей является следствием уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме (и ядрышке) нервных клеток.

Наиболее вероятным объяснением уменьшения поглощения у.-ф. лучей в области 257—280 мμ клетками мозга при гипоксии представляется предположение, что снижение поглощения у.-ф. лучей в наших опытах является следствием уменьшения содержания в клетках коры мозга рибонуклеопротеидов. В пользу этого говорит ряд наблюдений.

Л. Ф. Ларионов ([12]) наблюдал уменьшение поглощения у.-ф. лучей цитоплазмой клеток при их повреждении и умирании и считает, что при этих состояниях непрочная связь между белком и нуклеиновой кислотой нарушается и рибонуклеиновая кислота, не удерживаясь в цитоплазме, поступает в окружающую среду.

То же предположение высказывают С. Н. Александров, С. Е. Манойлов и Б. А. Орлов ([15]). Действуя на срезы печени различными повреждающими агентами, они обнаружили в случае обратимого повреждения в омывающем растворе рибонуклеиновую кислоту. По их мнению, рибо-

нуклеиновая кислота отделяется от белка, будучи связанной с ним непрочной солеобразной связью, и диффундирует из клетки.

Диффузию веществ, содержащих пуриновые и пиримидиновые основания, наблюдал Г. И. Роскин ([16]) при исследовании умирающей протозойной клетки. С другой стороны, Кребс и Эглстон ([17]) и Диксон ([18]) показали, что в анаэробных условиях наблюдается усиленный выход ионов калия из срезов коры мозга в окружающую среду, что указывает на повышенную проницаемость клеток в этих условиях. Все эти данные дают основание предполагать, что в наших опытах имеет место распад нуклеопротеидов, и в первую очередь цитоплазмических, на более мелкие структурные компоненты (нуклеиновые кислоты, нуклеотиды и т. д.), сопровождающийся выходом их из клетки. При гипоксии, повидимому, имеет место и нарушение процессов синтеза нуклеиновых кислот. Поэтому уменьшение содержания нуклеопротеидов и нуклеиновых кислот в клетках коры мозга при гипоксии надо понимать как следствие усиленного распада нуклеопротеидов, усиленного выхода нуклеиновых кислот и нарушения их синтеза.

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

Поступило
13 VI 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] К. Г. Громова, В. С. Шапот, ДАН, **78**, 941 (1951). [2] К. Г. Громова, Т. Е. Кудрицкая и др., Биохимия, **17**, 541 (1951). [3] H. De Luca, R. Rossiter, K. Strickland, Biochem. J., **55**, 193 (1953). [4] M. Findlay, R. Rossiter, S. Strickland, Biochem. J., **55**, 200 (1952). [5] В. А. Энгельгардт, Н. П. Лисовская, Биох. нервн. сист. (Сборн.), Киев, 1954, стр. 77. [6] Г. Е. Владимиров, Труды ВМА им. С. М. Кирова, **1**, 205 (1946). [7] Е. М. Крепс, А. А. Смирнов, Д. А. Четвериков, Биох. нервн. сист. (Сборн.), Киев, 1954, стр. 125. [8] H. Hyden, Symp. Soc. Exp. Biol., **1**, 152 (1947). [9] C. Hemberger, H. Hyden, Acta Oto-Laryngol. Suppl., 61 (1945). [10] Е. А. Моисеев, Физиол. журн. СССР, **33**, 557 (1947). [11] Е. А. Моисеев, А. А. Ферхмин, ДАН, **60**, 123 (1948). [12] Л. Ф. Ларионов, Тр. сесс. АМН СССР, 1948, стр. 193. [13] S. Brattgard, Acta Rediologica, suppl. 96 (1952). [14] В. П. Курковский, И. Р. Петров, Тр. ВМА им. С. М. Кирова, **21**, 3 (1940). [15] С. Н. Александров, С. Е. Манойлов, Б. А. Орлов, ДАН, **83**, 725 (1952). [16] Г. И. Роскин, цит. по И. М. Лимаренко, Усп. совр. биол., **38**, 227 (1954). [17] H. Krebs, L. Eggleston, Biochem. J., **44**, VII (1949). [18] K. Dixon, Biochem. J., 44, 187 (1949).