

**Зміни білкового складу
та активності трансаміназ сироватки крові і печінки щурів
під впливом великих доз
антигепатоцитотоксичної сироватки та АЦС**

І. М. Алексеева

*Відділ експериментальної терапії Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ*

Вивчення дії великих доз цитотоксичних сироваток на біохімічні та фізіологічні процеси в організмі становить інтерес з двох точок зору. По-перше, за реакцією організму на великі дози цитосироватки можна дістати уявлення про специфічність її дії і ступінь її біологічної активності, і це може бути підставою для застосування малих стимулюючих доз з метою підвищення функції органів і систем в організмі. По-друге, за допомогою великих пригнічуючих доз можна викликати порушення структури та функції органа, і це може бути експериментальною моделлю алергічного за природою ушкодження органа.

Вивченню дії антигепатоцитотоксичної сироватки присвячений ряд праць. Досліджували морфологічні зрушення в печінці і інших органах [9, 11], зміни вуглеводної функції печінки [10], зміни білкового складу сироватки крові як показник білоксинтезуючої функції печінки [7].

Нашою метою було вивчити вплив великих доз антигепатоцитотоксичної сироватки (АГЦС) на білковий склад сироватки крові, склад водорозчинних білків печінки та активність ферментів переамінування (глутаміно-піровиноградної та глутаміно-щавлевооцтової трансаміназ) в сироватці крові і у водорозчинних білках печінки. Білковий склад сироватки крові відбиває, значною мірою білоксинтезуючу функцію печінки, оскільки альбуміни, альфа-глобуліни і частково бета-глобуліни крові утворюються в печінці.

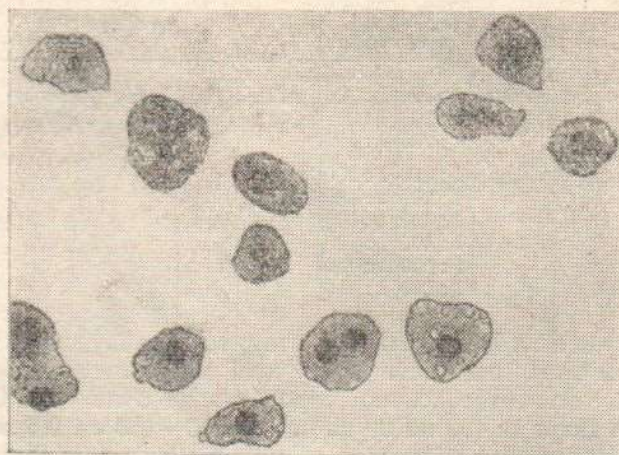
Вивчення складу водорозчинних білків печінки становить інтерес, по-перше, тому, що його зміни можуть якоюсь мірою відбивати зміни в складі структурних білків цього органа. Крім того, оскільки, на думку деяких дослідників [4, 19], білки сироватки і печінки перебувають у стані динамічної рівноваги, паралельне вивчення змін у складі водорозчинних білків печінки і сироватки крові може дати пояснення білковим зрушенням у крові. Зміни активності трансаміназ у печінці є добрим показником змін процесів синтезу білка в печінці на рівні утворення амінокислот з кетакислот. Визначення активності трансаміназ у сироватці крові було обране нами як тест тому, що, за даними ряду дослідників [13, 20], підвищена активність глутаміно-піровиноградної трансамінази (ГПТ) в сироватці крові є показником гострих уражень паренхіми печінки.

У цій статті наведені також дані про вплив великих доз АЦС на ті ж показники білкового обміну в організмі. Такі досліді були контролем до вивчення дії антигепатоцитотоксичної сироватки і становлять самостійний інтерес для з'ясування механізму дії АЦС.

Методика досліджень

Досліді проведені на 72 білих щурах — самках віком чотири — шість місяців.

Одержання антигепатоцитотоксичної сироватки і АЦС для щурів. Антигепатоцитотоксичну сироватку одержували імунізацією кроликів в одних випадках водно-сольовим екстрактом суцільної печінки, яку спочатку перфузували фізіологічним розчином, в других — екстрактом паренхіми печінки, в третіх —



Ізольовані клітини паренхіми печінки.

суспензією ізольованих клітин печінки. Антиген вводили чотири рази через день (експресний метод Ю. О. Спасокукоцького [12]). Титр сироватки визначали за реакцією зв'язування комплементу. АЦС одержували за аналогічною схемою імунізацією кроликів водно-сольовим екстрактом суміші селезінки і кісткового мозку щурів.

Методика виділення та очищення ізольованих клітин печінки. В основу нашої методики виділення та очищення клітин печінки покладено методику, описані в літературі [2, 14, 15, 18]. Печінку декапітованого щура промивали фізіологічним розчином через нижню порожнисту вену. З печінки знімали сполучнотканинну капсулу і скальпелем зскоблювали паренхіму. Паренхіму старанно подрібнювали ножицями і вміщували у 1:10 000 розчин трипсину з розрахунку 10 мл трипсину на 1 г паренхіми печінки. Через 20 хв суміш фільтрували через три шари марлі і фільтрат центрифугували при 1000 об/хв протягом хвилини. Осад відмивали від трипсину десятикратним об'ємом фізіологічного розчину і чотири рази центрифугували по одній хвилині при 1000 об/хв у розчині сахарози, нашаровуючи суспензію клітин, розведену в 0,25 М сахарозі, на подвійний об'єм 0,34 М сахарози. З суспензії клітин робили мазок, забарвлювали його азур-еозином і під мікроскопом перевіряли ступінь поділу клітин і відсутності відламків клітин. На рисунку наведений такий препарат ізольованих клітин печінки.

Визначення показників білкового обміну в організмі. В сироватці крові щурів визначали загальну концентрацію білка за методом Лоурі [17] та білкові фракції — за методом електрофорезу на папері.

Водорозчинні білки печінки одержували за методом Кузовлевої [6] із застосуванням рідкого азоту. Вміст водорозчинних білків печінки (з розрахунку на 100 г ваги сирої перфузованої печінки) визначали за методом Лоурі, фракційний склад цих білків — за методом електрофорезу на папері. Загальну концентрацію білка та білкові фракції виражали в г%. У сироватці крові та у фракції водорозчинних білків печінки визначали активність глютаміно-піровиноградної (ГПТ) та глютаміно-шавлевооцтової (ГШТ) трансаміназ за методом Райтмана і Френкель в модифікації Коровкіна [5].

Результати досліджень

Порівняльна серологічна оцінка трьох видів антигепатоцитотоксичної сироватки, одержаної імунізацією суцільною печінкою, паренхімою печінки і суспензією ізольованих клітин печінки, наведена в табл. 1, з якої видно, що імунізація паренхімою та ізольованими клітинами підвищує специфічність антигепатоцитотоксичної сироватки, зменшуючи її спорідненість до сполучної тканини. Ми використовували лише сироватки підвищеної специфічності. АЦС у перехресних реакціях з паренхімою печінки давала дуже низький титр.

Таблиця 1
Серологічна характеристика цитотоксичних сироваток

Вид сироватки	Титр з печінкою	Титр з селезінкою	Вид сироватки	Титр з печінкою	Титр з селезінкою
АГЦС (імунізація суцільною печінкою)	1:320 1:200 1:200	1:320 1:200 1:100	АГЦС (імунізація ізольованими клітинами печінки)	1:320 1:400 1:80 1:400	1:50 1:80 1:10 1:50
АГЦС (імунізація паренхімою печінки)	1:320 1:200 1:400 1:400 1:400 1:100	1:100 1:80 1:100 1:80 1:50 1:10	АЦС	1:10 1:10 1:10 1:40	1:200 1:320 1:160 1:400

I серія дослідів. Антигепатоцитотоксичну сироватку і АЦС вводили щурам протягом шести днів у дозі, яка була на межі смертельної. Для антигепатоцитотоксичної сироватки це були дози 0,2—0,25 мл сироватки при титрі 1:400 на щура вагою 150—160 г і 0,5 мл при титрі 1:200. Зміни показників білкового обміну під впливом великих доз сироваток визначали на 10—12-й день після останнього введення сироватки. За нашими попередніми даними та даними співробітників нашого відділу [1, 3], найбільш виражені зміни в організмі під впливом великих доз цитотоксичних сироваток спостерігаються саме в ці строки.

Контролем служили тварини такого ж віку і статі, що перебували в тих самих умовах утримання.

Дані про зміни білкового складу сироватки крові, печінки та активності трансаміназ у крові під впливом шестикратного введення великих доз антигепатоцитотоксичної сироватки і АЦС наведені в табл. 2. Антигепатоцитотоксична сироватка викликає порушення співвідношення білкових фракцій сироватки крові: зниження концентрації альбумінів і альфа-глобулінів і підвищення концентрації бета- і гамма-глобулінів. У печінці при цьому збільшується концентрація фракції Б. Активність трансаміназ у сироватці не змінюється.

Великі дози АЦС викликають зрушення в білковому складі сироватки крові, подібні до тих, що спостерігаються при введенні антигепатоцитотоксичної сироватки: знижується концентрація альбумінів і альфа-глобулінів. Концентрація ж бета- і гамма-глобулінів при цьому підвищена меншою мірою, ніж під впливом антигепатоцитотоксичної сироватки. У складі водорозчинних білків печінки спостерігається збільшення фракції Б і А. Активність трансаміназ у сироватці не змінилася.

II серія дослідів. Антигепатоцитотоксичну сироватку та АЦС вводили щурам протягом п'яти тижнів двічі на тиждень в дозі на межі смертельної. Зміни показників білкового обміну визначали на третій—п'ятий день після останнього введення. Результати дослідів наведені в табл. 3. Ці дані показують, що при тривалому введенні ні антигепато-

Таблиця 2

Білковий склад і активність трансаміназ сироватки крові та склад водорозчинних білків печінки у щурів на 10—12-й день після шестиразового введення великих доз АГЦС та АЦС

Група тварин	Кількість тварин	Сироватка крові						
		загальний білок	альбуміни	α-глобуліни	β-глобуліни	γ-глобуліни	ГПТ	ГЩТ
Контроль	12	9,8±2,2	4,1±0,2	1,6±0,1	2,1±0,1	1,8±0,1	9,2±0,8	27,2±1,0
	16	8,8±0,3	3,4±0,2	1,3±0,1	2,5±0,1	2,1±0,1	10,0±0,9	28,3±0,7
АГЦС		p>0,5	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p>0,2	p>0,2
АЦС	10	9,4±1,7	3,5±0,2	1,4±0,1	2,4±0,2	2,0±0,1	10,3±0,8	28,8±0,8
		p>0,5	p<0,05	p<0,02	p>0,2	p>0,2	p>0,2	p>0,2

Водорозчинні білки печінки

Група тварин	Кількість тварин	Загальний білок	Фракції				
			А	Б	В	Г+Д	Е+Ж
Контроль	12	3,4±0,1	0,2±0,02	0,4±0,05	0,7±0,04	1,1±0,08	0,9±0,05
	15	3,3±0,2	0,2±0,02	0,6±0,04	0,6±0,05	1,1±0,09	0,9±0,07
АГЦС		$p > 0,5$	$p > 0,5$	$p < 0,01$	$p > 0,1$	$p > 0,5$	$p > 0,5$
	10	3,3±0,1	0,1±0,03	0,6±0,05	0,7±0,05	0,9±0,09	0,9±0,1
АЦС		$p > 0,5$	$p < 0,02$	$p < 0,02$	$p > 0,5$	$p > 0,1$	$p > 0,5$

Дані представлені як $M \pm m$.

Таблиця 3

Білковий склад та активність трансаміназ сироватки крові і печінки у тварин після п'яти тижневого (двічі на тиждень) введення великих доз АГЦС та АЦС

Група тварин	Кількість тварин	Сироватка крові						
		загальний білок	альбуміни	α-глобуліни	β-глобуліни	γ-глобуліни	ГПТ	ГЩТ
Контроль	11	8,0±0,3	3,3±0,1	1,3±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1	12,5±0,8	24,7±0,9
	12	7,7±0,3	3,2±0,1	1,4±0,1	1,6±0,2	1,5±0,2	9,2±1,2	25,9±0,9
АГЦС		p>0,2	p>0,5	p>0,2	p>0,5	p>0,5	p<0,05	p>0,2
	11	7,2±0,4	3,0±0,2	1,2±0,1	1,6±0,1	1,5±0,1	10,5±0,9	24,7±1,0
АЦС		p>0,1	p>0,2	p>0,2	p>0,2	p>0,5	p>0,2	p>0,5

Водорозчинні білки печінки

Група тварин	Кількість тварин	Загальний білок	Фракції					ГПТ	ГЩТ
			А	Б	В	Г+Д	Е+Ж		
Контроль	11	3,0±0,2	0,1±0,08	0,4±0,05	0,4±0,08	1,0±0,05	0,9±0,03	1943±252	2730±186
	12	2,7±0,2	0,1±0,01	0,3±0,03	0,6±0,05	0,9±0,06	0,9±0,16	1085±207	2513±194
АГЦС		$p > 0,2$	$p > 0,5$	$p > 0,1$	$p < 0,05$	$p > 0,2$	$p > 0,2$	$p < 0,02$	$p > 0,2$
	11	2,8±0,12	0,1±0,01	0,3±0,04	0,5±0,04	0,9±0,09	0,9±0,08	1561±217	2758±394
АЦС		$p > 0,2$	$p > 0,5$	$p > 0,1$	$p < 0,01$	$p > 0,5$	$p > 0,5$	$p > 0,1$	$p > 0,5$

тоцитотоксична сироватка, ні АЦС не викликають змін у білковому складі сироватки крові. У складі водорозчинних білків печінки спостерігається збільшення концентрації фракції В як при введенні антигепатотоксичної сироватки, так і при введенні АЦС.

Активність глютаміно-піровиноградної трансамінази (ГПТ) в печінці і в сироватці крові під впливом великих доз антигепатотоксичної сироватки різко знижується. Під впливом АЦС активність ГПТ в сироватці крові і печінці при введенні антигепатотоксичної сироватки і АЦС істотно не змінюється.

Обговорення результатів досліджень

Одержані нами дані свідчать про те, що антигепатотоксична сироватка підвищеної специфічності, застосована в наших дослідках, у великих дозах викликає пригнічення білоксинтезуючої функції печінки, що проявляється в зниженні синтезу сироваткового альбуміну і альфа-глобуліну (І серія дослідів), у зниженні активності ферменту переамінування — глютаміно-піровиноградної трансамінази (ІІ серія дослідів). Великі дози антигепатотоксичної сироватки викликають також зміни в складі водорозчинних білків печінки.

АЦС, так само як і антигепатотоксична сироватка, викликає зниження концентрації альбуміну і альфа-глобуліну в сироватці крові. Проте, на відміну від антигепатотоксичної сироватки, АЦС майже не змінює активності глютаміно-піровиноградної трансамінази в печінці і в сироватці крові.

Білковий склад сироватки крові розглядають як «мезенхімну пробу» дослідження печінки [13] на відміну від визначення активності глютаміно-піровиноградної трансамінази в сироватці і печінці, яке називають «паренхімною пробою». З цих позицій стає зрозумілою схожість в дії антигепатотоксичної сироватки і АЦС на білковий склад сироватки крові і відмінність в дії на активність трансаміназ сироватки і печінки. В порівнянні з АЦС антигепатотоксична сироватка має виражену специфічність в дії на паренхіму печінки. Цікаво порівняти наші дані про зниження ГПТ в печінці з даними інших дослідників, які вивчали активність трансаміназ при інших патологічних станах печінки. Лопатіна [8] відзначає зниження активності ГПТ і ГЩТ при аліментарному цирозі печінки, викликаному малобілковою та безхоліною дієтою. При цьому зниження ГПТ було більш вираженим і починалося значно раніше, ніж зниження активності ГЩТ.

Порівнюючи зміни різних показників білкового обміну (білкового складу сироватки крові, складу водорозчинних білків печінки і активності трансаміназ сироватки та печінки) при введенні великих доз антигепатотоксичної сироватки і АЦС, можна бачити, що ці зміни не відбуваються паралельно. Тривале, розтягнуте введення антигепатотоксичної сироватки (ІІ серія дослідів) викликає істотне зниження активності ГПТ, але не змінює білковий склад сироватки крові. Цікаво відзначити, що схема введення сироватки (шість разів щоденно — І серія дослідів, і двічі на тиждень протягом п'яти тижнів — ІІ серія дослідів) спричиняє істотний вплив на ефект дії сироватки. Так, білковий склад сироватки крові при тривалому з інтервалами введенні сироваток, не змінюється, тоді як при шестиразовому введенні щодня тієї ж кількості сироватки, він змінюється дуже істотно. При тривалому з інтервалами введенні цитотоксичних сироваток відбувається, очевидно, компенсація тих зрушень, які викликали зміни білкового складу сироватки крові. Компенсації ж зрушень, які привели до зниження активності

ГПТ при введенні антигепатоцитотоксичної сироватки, при цьому не відбувається.

Одержані нами дані не дають підстави пояснювати зміни білкового складу сироватки крові істотним порушенням рівноваги між білками сироватки крові та водорозчинними білками печінки. На підставі даних про зниження концентрації альфа-глобулінів у сироватці і підвищення фракції Б у печінці (ця фракція близька за електрофоретичною рухомістю до альфа-глобулінів сироватки) при шестиразовому введенні сироваток можна думати лише про деяку затримку білків типу сироваткових альфа-глобулінів у печінці. Тим більш, що є дані про те, що альфа-глобуліни якоюсь мірою і імунологічно схожі з деякими білками печінки [16]. Зміни ж концентрації альбумінів, бета- і гамма-глобулінів у сироватці крові не пов'язані з порушенням рівноваги між білками крові і печінки.

Висновки

1. Застосування як антигену для одержання антигепатоцитотоксичної сироватки паренхіми печінки та суспензії ізольованих клітин печінки, за даними серологічних досліджень, підвищує специфічність антигепатоцитотоксичної сироватки, зменшуючи її спорідненість до сполучної тканини.

2. Великі дози антигепатоцитотоксичної сироватки пригнічують білоксинтезуючу функцію печінки, що проявляється у зниженні концентрації альбумінів і альфа-глобулінів сироватки крові, зниженні активності глютаміно-піровиноградної трансамінази в печінці і в сироватці крові. Великі дози антигепатоцитотоксичної сироватки викликають також зміни в складі водорозчинних білків печінки.

3. Великі дози АЦС на відміну від антигепатоцитотоксичної сироватки істотно не змінюють активність глютаміно-піровиноградної трансамінази в печінці і сироватці крові. За дією на білковий склад сироватки крові і печінки АЦС наближається до антигепатоцитотоксичної сироватки.

Література

1. Барченко Л. И.—Матер. междунар. симпоз. по иммунол. сперматозондов и оплодотворения, Варна, 1967.
2. Бордонос В. Г.—Аутоимунные процессы при поражениях печени в клинике и эксперим. Дисс. канд., К., 1967.
3. Зеленська Т. М.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1965, 11, 6.
4. Капланский С. Я.—VIII Всес. съезд физиол., биохим. Тезисы докл. М., 1955.
5. Коровкин Б. Ф.—Ферменты в диагностике инфаркта миокарда. «Медицина», 1965.
6. Кузовлева О. Б.—Методы выделения и электрофоретического исследования тканевых белков. Метод. письмо, 1960.
7. Кулик Г. І., Бикорез А. І.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1964, 10, 2.
8. Лопатина Л. А.—В кн.: Матер. II совещ. по клин. биохимии инфекц. болезней и симпозиума по клин. биохимии болезней печени, Рига, 1963.
9. Мажбич И. Б.—Труды Омского мед. ин-та, 1949, 2, 13.
10. Раушенбах М. О.—Архив патол., 1949, 11, 2.
11. Радионов Г. А., Король С. А.—Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1965, 2.
12. Спасокукоцкий Ю. О.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1964, 10, 6.
13. Тодоров И.—Клин. лаборат. исслед. в педиатрии, София, 1963.
14. Уманский Ю. А.—Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1965, 60, 8.
15. Федоровская М. И.—Изучение противоопухолев. сыворотки повышенной специфичности. Дисс. канд., К., 1966.
16. Hase T., Mahin D.—J. Immunol., 1965, 94, 2.
17. Lowry O. et al.—J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
18. Velley G. C.—Comptes Rend. Soc. Biol., 1959, 153, 1.
19. Whipple G. H. et al.—В кн.: Protein and protein hydrolysate. N. Y., 1946, 317.
20. Wroblewski F., La Due J.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91.

Надійшла до редакції
8.XII 1967 р.

**Изменения белкового состава
и активности трансаминаз сыворотки крови и печени крыс
под влиянием больших доз
антигепатотоксической сыворотки и АЦС**

И. Н. Алексеева

*Отдел экспериментальной терапии Института физиологии
им. А. А. Богомольца АН УССР, Киев*

Резюме

В работе показано, что применение в качестве антигена при получении антигепатотоксической сыворотки не цельной печени, а паренхимы и взвеси изолированных клеток паренхимы печени повышает специфичность антигепатотоксической сыворотки по отношению к паренхиме печени, уменьшая ее сродство к соединительной ткани. В работе представлены данные о действии больших доз антигепатотоксической сыворотки повышенной специфичности (полученной путем иммунизации паренхимной печени и взвесью изолированных клеток паренхимы) и АЦС на белковый состав сыворотки крови, количество и состав водорастворимых белков и на активность ферментов переаминирования (глутамино-пировиноградной и глутамино-щавелевоуксусной трансаминаз) в сыворотке крови и во фракции водорастворимых белков печени. Изучение действия больших доз цитотоксических сывороток представляет интерес потому, что по реакции организма на большие дозы цитосыворотки можно судить о специфичности их действия и степени их биологической активности. Установлено, что большие дозы антигепатотоксической сыворотки угнетают белоксинтезирующую функцию печени, что выражается в снижении концентрации альбуминов и альфа-глобулинов в сыворотке крови, снижении активности глутамино-пировиноградной трансаминазы в печени и сыворотке крови. Большие дозы антигепатотоксической сыворотки вызывают также изменения в составе водорастворимых белков печени. Большие дозы АЦС, в отличие от антигепатотоксической сыворотки, существенно не меняют активности глутамино-пировиноградной трансаминазы в печени и сыворотке крови. По действию на белковый состав сыворотки крови и состав водорастворимых белков печени АЦС приближается к антигепатотоксической сыворотке.

**Change in Protein Composition and Transaminase Activity
of Blood Serum and Liver under the Effect
of Great Doses of Antihepatocytotoxic Serum
and Antireticular Cytotoxic Serum (ACS)**

I. N. Alekseeva

*Department of Experimental Therapeutics, the A. A. Bogomoletz Institute
of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev*

Summary

It is shown that the application of not the whole liver but its parenchyma and suspension of parenchyma isolated cells as an antigene in preparing antihepatocytotoxic serum increases the specificity of anti-

hepatocytotoxic serum, decreases its affinity to the connective tissue. It is established that the great doses of antihepatocytotoxic serum of an increased specificity inhibit protein-synthesizing function of the liver that is expressed in a decrease of albumine and alpha-globuline concentration in blood serum, decrease in the activity of glutamine-pyruvic transaminase in the liver and blood serum. Great doses of antihepatocytotoxic serum also evoke changes in the composition of water soluble proteins of the liver. Great doses of ACS, in contrast to antihepatocytotoxic serum, do not substantially change the activity of glutamine-pyruvic transaminase in the liver and blood serum. ACS, as to its effect on the protein composition of blood serum and composition of water soluble proteins of the liver, approaches antihepatocytotoxic serum.