

УДК 591.04

З. М. Газиев, Н. Е. Ковалев

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПЕЧЕНИ НЕКОТОРЫХ ЖИВОТНЫХ

Печень является полифункциональным органом, участвующим в обеспечении гомеостаза организма, и функциональные параметры ее, как у любой гомеостатической системы, осциллируют около некоторых средних величин [2, 16]. Иллюстрацией этому служат суточные колебания: распределение температуры, гликогенообразование, сорбционные свойства, распределение и концентрация РНК, митотическая активность клеток печени, наблюдаемые в физиологических условиях [4, 5, 15 и др.].

Наличие более длительных ритмов в печени, в частности, сезонных флуктуаций активности гепатоцитов в связи с циклическим изменением геофизических условий среды до сих пор не установлено. Вероятность подобных циклов в печени очень велика, если учесть, что в органах, физиологически сходных с ней (скелетная мышца, мозг и др.) ряд параметров: резистентность, вязкость, поглощение кислорода, содержание гликогена подвергаются четким сезонным колебаниям [3, 11, 13, 14, 16 и др.].

Мы изучали сезонные изменения сорбционных свойств печени животных по отношению к витальным красителям. Сорбционные свойства клеток, зависящие от химического и адсорбционного связывания красителя и его растворения в клеточной протоплазме, являются интегральным показателем функционального состояния клетки [9 и др.].

Методика исследований

Мы пользовались методом прижизненной окраски, разработанным в лаборатории Насонова [9] и усовершенствованным другими цитологами [18, 21]. Тинкториальные свойства тканей животных определяются многими факторами; так, в покое ткани обычно поглощают мало красителя, при возбуждении и повреждении клеток окрашиваемость тканей подвергается значительным изменениям. Характер и направленность этих изменений определяются уровнем функциональной активности клеток, а также в меньшей степени — свойствами действующего фактора и красителя [8, 9 и др.].

По современным представлениям, преимущественную роль в поглощении красителей тканями играют клеточные белки и нуклеиновые кислоты. Между разноименно заряженными ионными группами белков и красителей возникают силы взаимного притяжения. Для кислотных красителей (бромтимоловый синий, феноловый красный и др.) электростатические силы имеют значение лишь при pH раствора меньшем, чем изоэлектрическая точка (ИЭТ) белков. Если же pH равен или больше ИЭТ, то вступают в силу вандерваальсовы взаимодействия между неполярными или гидрофобными радикалами молекул красителей и белков. Некоторые кислотные красители вступают в связь с сорбентом не только ионными и гидрофобными, но и водородными связями. Путем дифференциальной экстракции нервов, окрашенных бирюзовым светопрочным удалось установить, что 50% сорбированного красителя связывается неполярными, 34% ионными и 25% множественными водородными связями [6, 8 и др.].

Опыты проведены на самцах озерной лягушки *Rana ridibunda* весом 50—60 г и белой лабораторной крысы *Rattus norvegicus* весом 150—170 г одного и того же возраста, в одно и то же время (15.00, 18.00) в каждом сезоне года (январь, апрель, июнь—июль, октябрь).

В первом варианте извлеченные из тела животного после декапитации тонкие кусочки органа (толщиной 1—2 мм, весом 50 мг) помещали в раствор Рингера на 20—

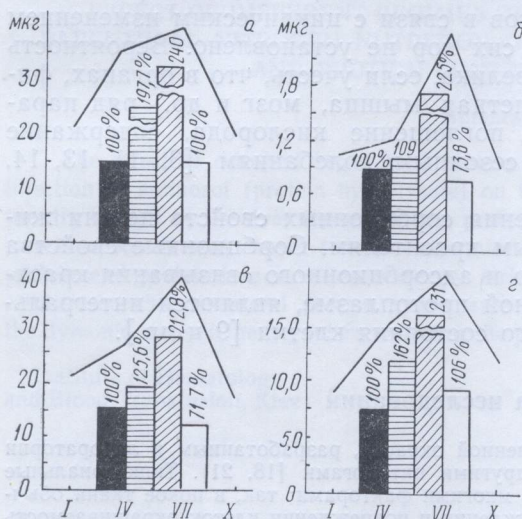
30 мин,* затем ткань переносили в 0,025% раствор нейтрального красного или 0,05% раствор фенолового красного (на жидкости Рингера) на 45 мин.

Во втором варианте раствор нейтрального красного (на жидкости Рингера без соды) вводили в брюшную полость животного из расчета: лягушке—0,1 мл 0,1% раствора на 1 г веса тела, крысе — 1 мл 0,5% раствора на 50 г веса тела. Через 1 ч животных забивали и извлекали исследуемый орган. Ткань, окрашенную в изоляции и в организме, очищали от поврежденных участков, взвешивали на торсионных весах и помещали в подкисленный спирт при окраске нейтральным красным или в 2% щелочный раствор на 70° спирте при окраске феноловым красным на 24 ч. Экстрагированный краситель измеряли на фотометре (ФЭК-М). Показания фотометра в экстинкциях по калиброванной кривой переводили в мкг и рассчитывали на 100 г сухого веса ткани. Полученные данные обрабатывали статистически. Различия считались не случайными при $p=0,05$. Всего во всех сезонах с двумя красителями на двух видах животных поставлено 160 опытов.

Результаты исследований

В первой серии опытов изолированную печень лягушки окрашивали нейтральным красным (44 опыта).

Из таблицы и рисунка, а видно, что сорбционные свойства печени закономерно изменяются по сезонам года. В январе печень сорбирует наименьшее количество красителя ($18,5 \pm 2,7$ мкг). В апреле и, особен-



Сорбционная способность клеток печени лягушки (а, б) и крысы (в, г), окрашенных нейтральным красным (а, б, в) и феноловым красным (г) в различные сезоны года в состоянии изоляции (а, в, г) и в целом организме (б).

По горизонтали—месяцы, по вертикали — сорбция в мкг на 100 мг сухого веса. Сорбция выражена в абсолютных числах (сплошная линия) и процентах к зимнему уровню, принятому за 100.

но, в июне — июле сорбционные свойства печени усиливаются ($36,5 \pm 5,0$ и $44,5 \pm 6,5$ мкг) и составляют по отношению к зимнему уровню соответственно 197 и 240,5% ($p < 0,01$). В октябре сорбция печени падает до уровня зимнего периода ($18,5 \pm 2,0$ мкг), составляя, как и зимой — 100%.

Поскольку в состоянии изоляции клетки печени быстро повреждаются вследствие нарушения кровообращения и подвергаются автолизу [7], в другой серии опытов этот орган окрашивали в целостном организме (выполнено 42 опыта, см. таблицу и рисунок, б). В данной, как и в предыдущей серии опытов подтверждается та же закономерность, за исключением того, что более резко выражена разность между осенне-зимним и летним уровнем сорбции в печени: в январе она составляет $88 \pm 11,7$; в апреле — $96 \pm 1,5$, а в июне — $198 \pm 1,5$ мкг, что составляет по отношению к зимнему сезону 225% ($p < 0,01$).

* Этот срок необходим для посттравматической репарации и более полной сорбции красителя.

Сорбционные свойства печени лягушки и крысы в различные сезоны года при окраске ткани витальными красителями

Сезон года	Виды красителя и условия окраски		Вид животного	<i>n</i>	$M \pm m$	$\frac{M_0 \cdot 100}{M_K \%}$	<i>p</i>
Январь	нейтралрот	в изоляции	лягушка	10	$18,5 \pm 2,7$	100	
	нейтралрот	в организме	лягушка	12	$88,0 \pm 1,1$	100	
	нейтралрот	в изоляции	крыса	12	$19,5 \pm 1,5$	100	
	фенолрот	в изоляции	крыса	11	$8,0 \pm 1,0$	100	
Апрель	нейтралрот	в изоляции	лягушка	11	$36,5 \pm 5,00$	197,73	$<0,01$
	нейтралрот	в организме	лягушка	10	$96 \pm 1,5$	109,0	$<0,05$
	нейтралрот	в изоляции	крыса	10	$24,5 \pm 1,6$	125,6	$<0,01$
	фенолрот	в изоляции	крыса	10	$13,0 \pm 1,5$	162,5	$<0,01$
Июнь—июль	нейтралрот	в изоляции	лягушка	10	$44,5 \pm 6,5$	240,5	$<0,01$
	нейтралрот	в организме	лягушка	11	$19,8 \pm 1,5$	225,0	$<0,01$
	нейтралрот	в изсляции	крыса	11	$41,5 \pm 1,0$	212,0	$<0,01$
	фенолрот	в изоляции	крыса	12	$18,5 \pm 2,0$	231,0	$<0,01$
Октябрь	нейтралрот	в изоляции	лягушка	10	$18,5 \pm 2,0$	100,0	$>0,05$
	нейтралрот	в организме	лягушка	12	$65,0 \pm 3,5$	73,8	$>0,05$
	нейтралрот	в изоляции	крыса	12	$14,0 \pm 1,5$	71,7	$>0,05$
	фенолрот	в изоляции	крыса	11	$8,5 \pm 1,5$	106,25	$>0,05$

Примечание. *n*—число опытов; *M*—средняя величина ссрбции в *мкг*; *m*—средняя квадратическая ошибка; *M_к*—средняя величина ссрбции в зимний период; *M₀*—средняя величина ссрбции в другие сезоны; *p*—вероятность случайности различий между зимней сорбцией и ссрбцией в другие сезоны. Нейтралрот 0,025 % раствор для окраски изолированной ткани и 0,1 % раствор для окраски в организме. Фенолрот—0,05 % раствор.

Приведенные данные были получены на холоднокровных животных (озерная лягушка), у которых жизнедеятельность организма строго приурочена к сезонным геофизическим ритмам и нет выраженного гомеостазиса [14]. Поэтому следующую, третью серию опытов мы поставили на теплокровных животных — белых лабораторных крысах. Животных содержали в условиях естественной смены дня и ночи при относительно стабильной температуре (зимой -20°C , летом -25°C). Кормление животных производили два раза в сутки стандартной пищей, но корм в клетке всегда оставался в избытке. Печень крысы окрашивали нейтральным красным. Результаты опытов, представленные в таблице и на рисунке, показывают еще более четкое сезонное колебание окрашиваемости органа. В январе сорбция печени относительно низкая — $19,5 \pm 1,5$ *мкг*, а апреле достоверно увеличивается — $24,5 \pm 1,6$ *мкг*, а в июне — июле достигает максимума — $41,5 \pm 1,02$ *мкг* и составляет по отношению к зимнему сезону 313,8% ($p < 0,01$). В октябре — сентябре сорбция ткани снижается ($14,0 \pm 1,5$ *мкг*) по сравнению с зимним временем, но недостаточно ($p > 0,05$).

При окраске печени нейтральным красным в гепатоцитах возникает интенсивная гранулообразовательная реакция. Поэтому приведенные данные могут говорить лишь о флуктуации гранулообразовательной функции клеток печени. Чтобы определить роль сорбции и гранулообразовательного процесса в увеличении поглощения красителя печенью в летнее время была проведена специальная серия опытов с использованием кислотного красителя — фенолового красного, который распределяется внутри клеток диффузно. Окрашивалась изолированная печень крысы. Результаты, представленные в таблице и на рисунке, показыва-

ют, что сорбционные свойства действительно претерпевают сезонные колебания. В январе сорбция фенолового красного самая низкая ($8,0 \pm 1,0$ мкг), в апреле она значительно повышается ($13,0 \pm 1,5$ мкг) и составляет по отношению к зимнему сезону 162% ($p < 0,01$), а в июле достигает максимального уровня ($18,5 \pm 2,0$ мкг), равного 231% по отношению к зиме ($p < 0,01$). Наконец, в октябре сорбция значительно падает ($8,5 \pm 1,5$ мкг), но еще не достигает зимней величины.

Обсуждение результатов исследований

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что сорбционные свойства и гранулообразовательная функция клеток печени являются неоднозначными в различные сезоны года. Весной и летом они усиливаются, а осенью и зимой ослабевают. Сходным сезонным колебаниям подвергаются сорбционные свойства полушарий мозга и гвialiнового хряща лягушки по отношению к витальным красителям: нейтральному красному и феноловому красному [3]. Почти полное совпадение сезонных колебаний сорбционных свойств разнородных тканей различных животных по характеру и направленности изменений говорит об их достоверности и закономерном характере.

В литературе принято, что сорбционные свойства тканей изменяются под воздействием внешних повреждающих факторов [9 и др.]. Более пристальное исследование показало, что сорбционные свойства тканей по отношению к витальным красителям могут изменяться также и в целом, интактном организме под влиянием адекватных физиологических раздражителей: видимого света, слышимого звука, ацетилхолина, тироксина, а также при условнорефлекторном раздражении животного [8, 9 и др.]. Волнообразные изменения сорбционных свойств клеток печени, установленные нами также в интактном организме, являются выражением комплекса сезонных факторов, действующих на животное: свет, долгота дня, температура среды, атмосферное давление и т. д. Они косвенно, при участии эндокринных органов вызывают тонкие структурные сдвиги цитоплазматических белков гепатоцитов [14]. Поскольку в наших опытах исключается какое бы ни было повреждение печени, логично думать, что речь идет лишь о небольших структурных изменениях белковых молекул протоплазмы, возникающих в физиологических условиях под влиянием слабых раздражителей (например, гормонов); такие небольшие изменения структуры белка влекут за собой существенно выраженные изменения величины сорбирующей его поверхности [6, 8].

Возникновение подобных изменений в изолированных клеточных белках (β -фосфоорилаза, гемоглобин и др.) под влиянием слабых раздражителей (АТФ, АДФ, гормоны в физиологических дозах, кислород и т. д.) установлено с помощью рентгеноструктурного анализа и дисперсии оптического вращения. Происходящая при этом активация гидрофобных радикалов ведет к изменению структуры белка и усилению его сорбционной способности по отношению к витальным красителям: бромтимоловому синему, метиленовому синему [2, 17, 19, 20 и др.]. О возможности сезонных структурных изменений в организме указывают данные целого ряда авторов [11, 14, 16 и др.], отметивших увеличение вязкости и терморезистентности скелетной мышцы различных животных в летнее время.

В механизме сорбции помимо структурных сдвигов определенную роль играет содержание белков, РНК, молекул сахаридов и других клеточных компонентов [4, 5 и др.]. Известно, что содержание белков и

РНК в гепатоцитах печени лягушки в летнее время возрастает [4]. Эти данные хорошо коррелируют с усилением сорбционных свойств печени лягушки и крысы в наших опытах [9].

Таким образом, приведенные данные позволяют считать, что под влиянием совокупности сезонных факторов в печени происходят колебательные изменения структурного состояния клеточной цитоплазмы и содержания в ней РНК, белков, и возможно, других клеточных компонентов, определяющих сезонные колебания сорбционных свойств печени. Весьма характерно, что амплитуда сезонных колебаний сорбционной способности неодинакова для различных тканей [3]. По кратности увеличения сорбции в летнее время по отношению к зимнему уровню ткани располагаются в следующий ряд: кишечник (1,30), печень (0,84), почка (0,30) *, скелетная мышца (0,23) *, мозг (0,035) *.

Сезонные колебания некоторых параметров тканей (резистентность мышц) вызываются гормонами щитовидной железы, деятельность которой в свою очередь подвергается сезонным флуктуациям [16 и др.]. Гормоны этой железы оказывают стимулирующее влияние на структуру и метаболизм [10]. Обмен веществ в тканях может усиливаться, либо ослабляться под влиянием тироксина. Все это дает основание думать, что волнообразное изменение сорбционных свойств печени, установленное нами по сезонам года, является отражением сезонных колебаний активности щитовидной железы [3, 12].

Таким образом, мы установили, что сорбционные свойства печени лягушки и крысы по отношению к витальным красителям в течение года подвергаются достоверным сезонным колебаниям: в весенне-летний период сорбционная способность повышается, а в осенне-зимнее время падает. Отсюда вытекает вывод, что функциональные свойства клеток печени, как внутреннего гомеостатического органа, претерпевают колебания как с короткими, так и длинными периодами. Сезонные изменения сорбционных свойств присущи и другим органам. Однако главной особенностью печени является высокая амплитуда сезонных колебаний сорбционной способности ее клеток. Монотонный характер сезонных изменений окрашиваемости разнородных тканей животных в наших опытах, а также литературные данные о причинах колебаний чувствительности клеток к витальным красителям дают основание предположить, что в основе сезонных флуктуаций сорбционных свойств печени лежат обратимые структурные и цитохимические изменения клеток, возникающие под влиянием совокупности сезонных факторов, воздействующих на организм. В реализации влияния этих факторов, на наш взгляд, имеют значение сезонные колебания активности щитовидной железы.

Литература

1. Бреслер В. М., Черноградская Н. А., Пильщик Е. М., Шудель М. С., Кудрявцева М. В., Сливанова Г. В., Розанов Ю. М., Веселкина М. Н., Астошина Т. П. Количественное изучение пролиферирующих нормальных и опухолевых печеночных клеток крыс и мышей. 1. Цитофотометрические исследования регуляции клеточного обмена в живых изолированных клетках регенерирующей печени крыс.— Цитология, 1966, 8, № 3, с. 59—70.
2. Болотина И. А., Волькенштейн М. В., Завадский П., Марков Д. С. Поляриметрическое исследование конформационных изменений d-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.— Биохимия, 1966, 31, № 4, с. 649—653.
3. Газиев З. М., Ковальов М. О. Сезонные изменения сорбционных свойств полушариев мозга и хрящевой ткани лягушки.— Физиол. журн. АН УРСР, 1975, 21, № 4, с. 512—518.

* Цифры означают величины сорбции в мкг красителя на единицу (100 г) сухого веса ткани.

4. Граменицкий Е. М. Сезонные изменения содержания белков и рибонуклеиновой кислоты в печеночных клетках.— Журн. общая биология, 1962, 23, № 4, с. 311—312.
5. Губин Г. Д., Петрова Р. М. Цитохимический анализ физиологической ритмики концентрации нуклеиновых кислот и гликогена в клетках печени и мозга у млекопитающих.— Цитология, 1967, 9, № 1, с. 116—121.
6. Комиссарчук Я. Ю., Левин С. В. Электронномикроскопическое изучение распределения фталоцианинового красителя в витально окрашенных аксонах краба.— Цитология, 1964, 6, № 5, с. 605—608.
7. Кростовцева Н. В. Прекращение притока крови к печени и предупреждение его последствий. М., 1971. 159 с.
8. Левин С. В. Исследование конформационных изменений белков путем анализа их взаимодействия с органическими красителями.— В кн.: Механизмы проницаемости, возбуждения и повреждения клетки. Л., 1969, с. 41—63.
9. Насонов Д. Н. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. М.-Л., 1962. 426 с.
10. Питтендрай К. Циркадные ритмы и циркадная организация живых систем. Биологические часы. М., 1964, с. 263—306.
11. Пашкова И. М. Соотношение теплоустойчивости мышц и уровня активности щитовидной железы травяных лягушек в разные сезоны года.— В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М.-Л., 1965, с. 83—89.
12. Романов С. Н., Романова Р. А. Изменения клеточной резистентности организма под влиянием гормонов щитовидной железы.— ДАН СССР, 1965, 160, № 1, с. 209—212.
13. Схолль Е. Д. Сезонные изменения теплоустойчивости мышц и мышечных моделей полевки.— Цитология, 1970, 12, № 8, с. 1020—1027.
14. Ушаков Б. П. Современное состояние вопроса о механизме теплового повреждения и причинах изменения теплоустойчивости клеток.— В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М.-Л., 1965, с. 5—54.
15. Хейфец Б. Я. Исследование периодических процессов печени кошки в остром опыте. Научн. труды Куйбышевского мединститута, 1973, 108, с. 100—106.
16. Шляхтер Н. А. Теплоустойчивость мышц лягушки в разные сезоны года.— Цитология, 1961, 3, № 1, с. 95—99.
17. Antonini E., Wyman S., Moretti R., Rossi-Flanelli A. The interaction of bromtymol blue with haemoglobin and its effect on the oxygen equilibrium.— Biochem. et Biophys. acta, 1963, 71, p. 124—138.
18. Holmberg B. On the permeability to Lissamine green and other dyes in the course of cell injury and cell death.— Exper. Cell. Research., 1963, N 22, p. 406—414.
19. Tonomura J., Sekia K., Imamura K. The optical rotatory dispersion of myosin A. IV. Conformational changes in meromyosin.— Biochem. et Biophys. acta, 1963, 78, N 4, p. 690—697.
20. Ullmann A., Vogelos P., Monod S. The effect of 5-odenylic acid upon the association between bromtymol blue and muscle phosphorilase-b.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, 17, N 1, p. 86—92.
21. Weimer V. Activation of corneal stromal cells to take up the vital dye neutral red.— Exp. Cell Res., 1959, N 18, p. 1—14.

Дагестанский медицинский институт;
Кубанский медицинский институт

Поступила в редакцию
7.I 1977 г.

Z. M. Gaziev, N. E. Kovalëv

SEASONAL CHANGES IN SORPTION PROPERTIES OF LIVER IN SOME ANIMALS

Summary

The seasonal changes were studied in sorption properties of the *Rana ridibunda* and *Rathus norvegicus* liver. The sorption properties of the liver in the animals under study are established to intensify at spring-summer time and to fade away in the autumn-winter period. The same regularity is found in the other tissues as well. A high amplitude of seasonal variations of sorption properties of the liver cells is a characteristic feature of the liver. The reversible structural and cytochemical changes in cells which arise under the effect of seasonal factors are supposed to be the basis of seasonal fluctuations of the liver sorption properties. The seasonal variations in the thyroid gland activity are the most essential factors.

Department of Biology, Medical
Institute, Daghestan; Department of Biology,
the Kuban Medical Institute