

ость у
—104.
1976,

жение
аорты

1929,

эств.—

якцио-
норме,

зом.—

истема
№ 3,

примен-

n chez

clerose
roscler-

fect on

имму-
—38.

n. Inst.

par des
es clin.

дакцию
1982 г.

УДК 612.357.3:612.015.348

И. Н. Алексеева

РОЛЬ СИНТЕЗА БЕЛКА В ИЗМЕНЕНИИ ЖЕЛЧЕТОКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОТИВОПЕЧЕНОЧНЫХ АНТИТЕЛ

Процессы синтеза белка в печени лежат в основе осуществления ряда ее функций, в том числе и образования жидкой части желчи.

Образование каналикулярной желчи, связано с активным транспортом натрия из гепатоцитов в желчные капилляры [7, 8, 9]. Этот транспорт происходит при участии белка—фермента Na^+ , K^+ АТФазы [10, 15]. Желчные кислоты оказывают влияние на интенсивность образования каналикулярной желчи созданием осмотического градиента [11, 17] либо воздействием на активность Na^+ , K^+ АТФазы [16]. Содержание желчных кислот в гепатоцитах и желчи в значительной степени зависит от белоксинтетических процессов в печени, поскольку многие этапы синтеза желчных кислот и их энтерогепатической циркуляции являются ферментозависимыми.

Прямым доказательством роли процессов синтеза белка в образовании жидкой части желчи являются результаты опытов с применением циклогексимида. Введение этого ингибитора белкового синтеза за 8 ч до начала сбора желчи тормозило спонтанное желчеотделение у крыс [12].

Наши ранее проведенные исследования показали, что пятикратное введение больших доз антигепатотоксической сыворотки (АГЦС) в дозе 6 мг белка в гамма-глобулиновой фракции на 100 г массы тела вызывает нарушение желчеотделительной функции печени, выражающееся в снижении уровня желчотока, уменьшении концентрации и содержания желчных кислот в желчи. Применение малых доз АГЦС (6×10^{-5} мг белка в гамма-глобулиновой фракции на 100 г массы тела) на фоне поражения печени четыреххлористым углеродом способствовало нормализации желчеотделительной функции, сопровождающейся повышением уровня желчотока на третьи сутки после последнего введения АГЦС [3]. Установлено, что под влиянием больших доз АГЦС снижается содержание сывороточных белков, синтезирующихся в печени, уменьшается активность ряда ферментов в печени, а под влиянием малых доз АГЦС повышается содержание водорастворимых белков в печени и активность некоторых ферментов [1, 2, 5]. Эти данные свидетельствуют о возможном нарушении процессов синтеза белка в печени при введении больших доз АГЦС и стимуляции белоксинтетических процессов при введении малых доз этой сыворотки.

Целью настоящих исследований было установить, имеется ли связь между изменением уровня желчотока у крыс под влиянием больших и малых доз АГЦС и интенсивностью белкового синтеза в печени. Для этого изучали белковообразовательную функцию печени по данным включения ^{14}C -белкового гидролизата в суммарные белки печени, определяли уровень желчотока, проводили регрессионный и корреляционный анализ связи между двумя этими показателями, определяли активность Na^+ , K^+ АТФазы в плазматических мембранах печени, а также изучали влияние циклогексимида на уровень желчотока в условиях применения АГЦС.

Методика исследований

Исследования проведены на 216 крысах линии Вистар. АГЦС получали путем иммунизации кроликов антигенным материалом из печени крыс. Из АГЦС выделяли гамма-глобулиновую фракцию. Большие дозы АГЦС (6 мг белка в гамма-глобулиновой

фракции на 100 г массы тела) вводили крысам пять дней подряд. Малые дозы АГЦС ($6 \cdot 10^{-5}$ мг белка в гамма-глобулиновой фракции на 100 г массы тела) вводили трехкратно на фоне поражения печени четыреххлористым углеродом. 0,4 мл 50 % масляного раствора CCl_4 вводили крысам под кожу трехкратно с интервалом в два дня. АГЦС применяли на следующий день после каждого введения CCl_4 .

Уровень желчеотока у крыс определяли в остром опыте под нембуталовым наркозом при шестичасовом сборе желчи. Интенсивность белкового синтеза изучали методом включения ^{14}C -белкового гидролизата в суммарные белки печени. Препарат в дозе 20 мКи/100 г массы тела вводили крысам внутривенно за 2 ч до забоя. Навеску перфузированной печени гомогенизировали с 0,85 % $NaCl$, центрифугировали 10 мин при 350 g. Белки осаждали ацетоном, растворяли в 30 % перекиси водорода при 60 °C, добавляли жидкий сцинтиллятор ЖС-8 и на автоматическом счетчике SL-30 определяли количество импульсов в мин, рассчитывая их на 1 мг белка. Активность Na^+ , K^+ АТФазы определяли в двух фракциях плазматических мембран печени: фракции, содержащей преимущественно каналикулярные мембраны, и фракции, содержащей преимущественно синусоидальные и латеральные мембраны гепатоцитов. Выделение двух фракций плазматических мембран проводили по [14]. Для этого микросомальную фракцию печени насливали на раствор сахарозы трех плотностей: 1,20; 1,16; 1,03 г/см³. После центрифугирования в течение 120 мин при 110000 g на границах плотностей сахарозы 1,20—1,16 обнаруживали слой частиц, состоящий из синусоидальных и латеральных мембран, а на границе плотностей сахарозы 1,16—1,03 — слой, состоящий из каналикулярных мембран. Активность Na^+ , K^+ АТФазы определяли по количеству фосфора, выделяемого в результате расщепления АТФ при участии АТФазы, активируемой ионами натрия и калия в присутствии ионов магния [13]. Для реакции использовали следующую инкубационную среду в конечных концентрациях: 2 ммоль $MgCl_2$, 100 ммоль $NaCl$, 20 ммоль KCl , 50 ммоль трис HCl , 2 ммоль АТФ, pH среды = 7,8.

Регрессионная зависимость между уровнем желчеотделения и интенсивностью белкового синтеза рассчитана методом наименьших квадратов. Расчет регрессионной зависимости проведен в лаборатории статистического анализа Института физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты включения ^{14}C белкового гидролизата в белки печени свидетельствуют о том, что пятикратное введение больших доз АГЦС вызывает угнетение белкового синтеза в печени (см. таблицу). В день последнего введения АГЦС интенсивность белкового синтеза составляет 35 % от уровня в контроле, на третьи сутки — 51 %, на пятые — 58 %. В эти сроки снижен и уровень желчеотока. К десятым суткам происходит восстановление как интенсивности белкового синтеза, так и желчеотделения. Коэффициент корреляции между количеством выделившейся желчи (уровень желчеотока) и количеством импульсов в мин на 1 мг белка (интенсивность белкового синтеза) в каждый отдельный срок наблюдения был низким ($r_{\text{контроль}}=0,370$; $r_{1\text{сут}}=0,256$; $r_{3\text{сут}}=-0,117$, $r_{5\text{сут}}=-0,069$; $r_{10\text{сут}}=0,001$). Однако, при расчете коэффициента корреляции в суммарной выборке (данные всех сроков наблюдения, $n=60$) он оказался высоким с большой степенью достоверности ($r=0,775$, $p<0,001$).

Регрессионный анализ выявил прямую пропорциональную зависимость между интенсивностью включения ^{14}C белкового гидролизата в белки печени и количеством выделившейся желчи в условиях применения больших доз АГЦС. Уравнение регрессии: $y=A+Bx$, где y — количество мл желчи, x — количество импульсов в мин при включении ^{14}C белкового гидролизата в белки печени — имело вид $y=0,07509+0,00024x$ со стандартной ошибкой коэффициента равной 0,00003. Линия регрессии представлена на рис. 1.

Под влиянием больших доз АГЦС снижалась активность Na^+ , K^+ АТФазы в каналикулярных мембранах гепатоцитов (рис. 2.) На третьи сутки после последнего введения АГЦС она составляла 54 % от активности фермента в этой фракции у контрольных животных. Активность Na^+ , K^+ АТФ-азы во фракции синусоидальных и латеральных мембран изменялась незначительно.

Таким образом, под влиянием больших доз АГЦС снижается как уровень желчеотока, так и интенсивность белкового синтеза. Оба процесса связаны линейной зависимостью, и между ними существует пря-

мая коррелятивная связь. Снижение белоксинтетических процессов в печени желчеотока. Снижение уровня желчеотока, снижение активности этого фермента Na^+ , K^+ АТФазы, снижение активности этого фермента гепатоцитов, 2) уменьшение

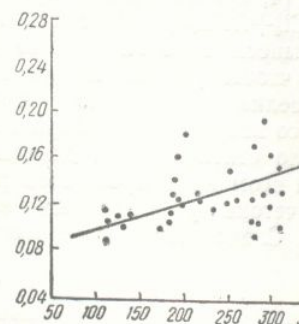


Рис. 1. Регрессионная зависимость интенсивности белкового синтеза в печени у крыс от интенсивности выделения желчи. По горизонтальной оси — интенсивность выделения желчи (имп/мин · мг белка), по вертикальной — интенсивность белкового синтеза (г/см³).

Рис. 2. Активность Na^+ , K^+ АТФазы в каналикулярных мембранах гепатоцитов на третьи сутки после пятикратного введения АГЦС. Белые столбцы — контроль, черные — АГЦС.

желчных кислот и их энтерогенного действия. Уменьшение желчеотока является уменьшением выделения желчи после введения АГЦС.

Уровень желчеотока (л/сут) гидролизата в суммарной фракции

Время исследования, сут	Статистический показатель
Контроль	n $M \pm m$
1	n $M \pm m$ p
3	n $M \pm m$ p
5	n $M \pm m$ p
10	n $M \pm m$ p

Введение малых доз АГЦС вызывало на третьи сутки понижение желчеотока ($CCl_4 - 0,19$; $+AГЦС - 0,234 \pm 0,005$, $p<0,001$). Активность белкового синтеза, по данным включе-

ы АГЦС
ли трех-
масыно-
ца дня.

м нарко-
ли мето-
т в дозе
Навеску
10 мин
ри 60 °С,
определя-
Na⁺, K⁺
книи, со-
стей преи-
ние двух
мальнойю
0,03 г/см³.
остей са-
латераль-
из кана-
фосфора,
емой ио-
вали сле-
Ю ммоль,

стью бел-
зной за-
азиологии

печени
з АГЦС
В день
состав-
ятые —
суткам
еза, так
вом вы-
в в мин
дельный
 $\Gamma_{\text{сут}} =$
з коэф-
ков на-
остовер-

зависи-
юлизата
ях при-
Бх, где
и вклю-
вид $y =$
равной

Na⁺, K⁺
а третьи
т актив-
тивность
мембран

ется как
оба про-
ирует пря-

мая коррелятивная связь. Это дает основание полагать, что ослабление белоксинтетических процессов в печени является основой уменьшения желчотока. Снижение синтеза белка, в печени, по-видимому, влияет на уровень желчотока двумя основными путями: 1) уменьшением синтеза фермента Na⁺, K⁺ АТФазы, о чем косвенно свидетельствует снижение активности этого фермента в плазматических мембранах гепатоцитов, 2) уменьшением ферментозависимых процессов синтеза

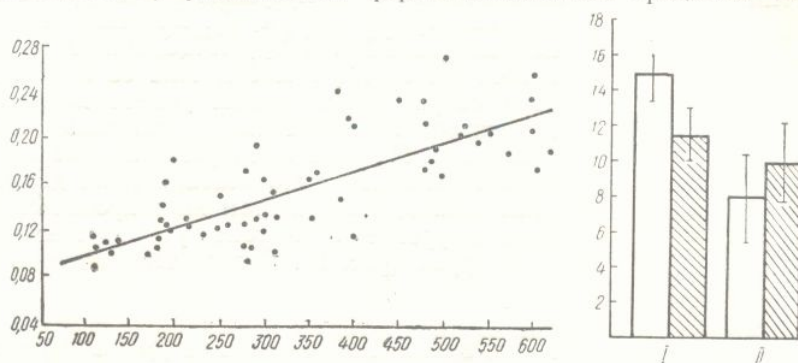


Рис. 1. Регрессионная зависимость между уровнем желчотока и интенсивностью белкового синтеза в печени у крыс в условиях применения больших доз АГЦС.

По горизонтали — интенсивность включения ¹⁴С белкового гидролизата в суммарные белки печени (имп/мин · мг белка), по вертикали — уровень желчотока (мл/100 г массы тела · ч).

Рис. 2. Активность Na⁺, K⁺ АТФазы в плазматических мембранах гепатоцитов на третьи сутки после пятикратного введения больших доз АГЦС (ммоль Р_i/мг белка · ч). I — контроль, II — АГЦС. Белые столбики — каналикулярные мембраны, заштрихованные — синусоидальные и латеральные мембраны.

желчных кислот и их энтерогепатической циркуляции, доказательством чего является уменьшение концентрации и содержания желчных кислот в желчи после введения АГЦС [3].

Уровень желчотока (I) и интенсивность включения ¹⁴С белкового гидролизата в суммарные белки печени (II) у крыс после пятикратного введения доз АГЦС

Время исследования, сут	Статистические показатели	I		II	
		мл желчи/100 г массы тела · ч		имп/мин · мг белка	
Контроль	n	12		12	
	M ± m	0,207 ± 0,010		484 ± 26	
1	n	12		12	
	M ± m	0,112 ± 0,005		169 ± 18	
	p	<0,001		<0,001	
3	n	12		12	
	M ± m	0,124 ± 0,007		248 ± 12	
	p	<0,01		<0,01	
5	n	12		12	
	M ± m	0,139 ± 0,007		279 ± 19	
	p	<0,01		<0,01	
10	n	12		12	
	M ± m	0,198 ± 0,007		503 ± 23	
	p	>0,5		>0,5	

Введение малых доз АГЦС на фоне трехкратного применения CCl₄ вызывало на третьи сутки после последнего введения увеличение уровня желчотока (CCl₄ — 0,193 ± 0,014 мл/ч · 100 г массы тела; CCl₄ + АГЦС — 0,234 ± 0,005, p < 0,01). В этот срок активность белкового синтеза, по данным включения ¹⁴С белкового гидролизата в белки пе-

чени, при введении АГЦС — выше, чем при введении одного CCl_4 , CCl_4 — 230 имп/мин·мг белка; CCl_4 + АГЦС — 540 ($p < 0,001$).

Для того, чтобы проверить, обусловлено ли повышение уровня желчотока увеличением интенсивности белкового синтеза, мы провели исследования с применением ингибитора белкового синтеза антибиотика циклогексимида. Циклогексимид начинает снижать синтез белка в печени непосредственно после введения, прерывая его на уровне терминации трансляции [4, 6]. Введение крысам, получавшим CCl_4 и CCl_4 + АГЦС, циклогексимида в дозе 0,2 мг/100 г массы тела за 5 ч до начала сбора желчи (чтобы успели истощиться имеющиеся запасы белка) снижало уровень желчотока. Начиная со второго часа сбора желчи это снижение было статистически достоверным. Важно, что при этом нивелировалась разница в уровне желчотока у животных этих двух групп (рис. 3). Следовательно, есть осно-

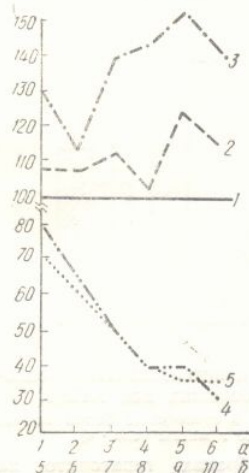


Рис. 3. Влияние циклогексимида на уровень желчотока у крыс на третьи сутки после трехкратного введения малых доз АГЦС на фоне поражения печени CCl_4 .

По горизонтали: а — время от начала сбора желчи (часы), б — время после введения циклогексимида (часы). По вертикали: уровень желчеотделения (процент к контролю). 1 — контроль, 2 — CCl_4 , 3 — CCl_4 + АГЦС, 4 — циклогексимид + CCl_4 , 5 — циклогексимид + CCl_4 + АГЦС.

вание считать, что прирост желчотока у крыс, получавших АГЦС на фоне применения CCl_4 , по сравнению с крысами, получавшими только CCl_4 , обусловлен увеличением интенсивности белкового синтеза. Усиление белкового синтеза в печени влияет на желчоток, по-видимому, посредством увеличения синтеза Na^+ , K^+ АТФазы, поскольку активность этого фермента в каналикулярных мембранах гепатоцитов у крыс, получавших АГЦС, выше, чем у крыс с введением одного CCl_4 (CCl_4 — 5,6 ммоль P_i /мг белка·ч; CCl_4 + АГЦС — 9,4, $p < 0,05$). Активность Na^+ , K^+ АТФазы во фракции синусоидальных и латеральных мембран гепатоцитов под влиянием АГЦС существенно не изменилась (CCl_4 — $5,7 \pm 2,6$; CCl_4 + АГЦС — $5,1 \pm 1,2$, $p > 0,5$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в основе изменения желчотока под влиянием различных доз антигепатотоксической сыворотки лежит нарушение интенсивности белкового синтеза в печени. Реализация нарушения синтеза белка в изменении желчотока происходит, по-видимому, через синтез Na^+ , K^+ АТФазы и ферментозависимые процессы синтеза желчных кислот и их энтерогепатической циркуляции.

I. N. Alekseeva

THE ROLE OF PROTEIN SYNTHESIS IN BILE SECRETION VARIATION UNDER ANTIHEPATIC ANTIBODY EFFECT

Summary

Experiments with rats show that a five-time application of antihepatocytotoxic serum (AHCS) in high doses (6 mg of protein in a γ -globulin fraction per 100 g of body mass) induces a decrease in the bile secretion level, reduction of intensity of ^{14}C -protein hydrolysate incorporation into total liver proteins and a fall of the Na^+ , K^+ -ATPase activity in the fraction of canalicular plasmatic hepatocyte membranes. A three-time application of low AHCS doses ($6 \cdot 10^{-5}$ mg of protein in a γ -globulin fraction per 100 g of body mass) against the liver affection with carbon tetrachloride induces on the 3d day an increase in the bile secretion level, in the intensity of ^{14}C -protein hydrolysate incorpo-

ration into the liver proteins and plasmatic hepatocyte membranes inhibitor, 5 hrs before bile collection AHCS decreases bile secretion

A. A. Bogomoletz Institute of Phys. Academy of Sciences, Ukrainian S.

1. Алексеева И. Н. Зміни білків і печінки шурів під впливом АГЦС. — Фізіол журн., 1968, 14.
2. Алексеева И. Н. Зміни вмісту крові шурів при введенні мального гострого ураження печінки ч. 45, № 3, с. 254—257.
3. Алексеева И. Н. Жовчовиділь малих доз антигепатотоксичес. с. 602—607.
4. Бойков П. Я., Сидоренко Л. І. ших животных. Активация сипульсного торможения трансл. с. 963—974.
5. Галенко Т. И. Исследование д. тивность ферментов в печени ук. — Киев, 1977. — 16 с.
6. Галкин А. П. Особенности ко. геномов продуктами трансляц. д-ра. биол. наук. Киев, 1977. — 2.
7. Есипенко Б. Е., Яременко М. (ших уровень желчеотделения. ния: Материалы II Всесоюз. 1971, с. 148—150.
8. Есипенко Б. Е., Воробей А. И. ме желчотока. — Фізіол. журн.,
9. Erlinger S., Dhumeaux D., Ver transport on bile formation in t 423.
10. Erlinger S., Dhumeaux D. Mec electrolytes. — Gastroenterology,
11. Forker E. L. Mechanisms of he N 1, p. 323—347.
12. Lock S., Witschi H., Plaa G. I. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1
13. Reichen J., Paumgartner G. Rel liver plasma membranes enrich p. 429—434.
14. Tauski H. H., Schorr E. A mic anic phosphorus. — J. Biol. Chen
15. Toda G., Oka H., Ikeda Y. Subf on the liver cell surface. — Biocl
16. Wannagat F. J., Adler R. D., O. dependent flow and plasma m Clin. Invest., 1978, 61, N 2, p. 297
17. Wheeler H. O. Secretion in bile. 1975, p. 87—110.

Институт физиологии им. А. А. Бог. АН УССР, Киев

CCl₄,

уровня
провели
антибио-
з белка
вне тер-
крысам,
ксимида
до на-
ощиться
уровень
ра жел-
остовер-
ась раз-
их этих
ть осно-

лчатока у
ия малых
Cl₄.
часы), б —
ертикали —
— контроль,
— циклогек-

ГЦС на
а только
за. Уси-
димому,
у актив-
з у крыс,
(CCl₄ —
ость Na⁺,
ан гепа-
(CCl₄ —

им, что в
гипепато-
елкового
зменение
ГФазы и
энтерог-

ration into the liver proteins and a rise in the Na⁺, K⁺-ATPase activity in canalicular plasmatic hepatocyte membranes. Application of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, 5 hrs before bile collection in rats which were administered CCl₄ and CCl₄+AHCS decreases bile secretion levelling its difference in the two groups of animals.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR

Список литературы

1. Алексеева И. Н. Зміни білкового складу та активності трансаміназ сироватки крові і печінки щурів під впливом великих доз антигепатоцитотоксичної сироватки та АЦС.— *Фізіол. журн.*, 1968, 14, № 6, с. 774—779.
2. Алексеева И. Н. Зміни вмісту білка і активності трансаміназ в печінці і сироватці крові щурів при введенні малих доз антигепатоцитотоксичної сироватки на фоні гострого ураження печінки чотирьохлористим вуглецем.— *Укр. біохім. журн.*, 1973, 45, № 3, с. 254—257.
3. Алексеева И. Н. Жовчовидільна функція печінки в умовах застосування великих і малих доз антигепатоцитотоксичної сироватки.— *Фізіол. журн.*, 1974, 22, № 5, с. 602—607.
4. Бойков П. Я., Сидоренко Л. И., Тидоров И. Н. Биогенез хроматина в клетках высших животных. Активация синтеза ядерных белков и ДНК гепатоцитов после импульсного торможения трансляции циклогексимидом.— *Биохимия*, 1979, 44, вып. 6, с. 963—974.
5. Галенко Т. И. Исследование действия антигепатоцитотоксической сыворотки на активность ферментов в печени и сыворотке крови: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1977.—16 с.
6. Галкин А. П. Особенности контроля транскрипции ядерного и митохондриального геномов продуктами трансляции цитоплазмы у высших животных. Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Киев, 1977.—31 с.
7. Есипенко Б. Е., Яременко М. С., Костромина А. П. и др. О механизмах, определяющих уровень желчеотделения.— В кн.: Физиология и патология органов пищеварения: Материалы II Всесоюз. конф. по физиологии и патологии пищеварения. М., 1971, с. 148—150.
8. Есипенко Б. Е., Воробей А. И., Костромина А. П. и др. О роли натрия в механизме желчотока.— *Физиол. журн.*, 1981, 27, № 1, с. 72—76.
9. Erlinger S., Dhumeaux D., Berthelot P., Dumont M. Effect of inhibitors of sodium transport on bile formation in the rabbit.— *Amer. J. Physiol.*, 1972, 219, N 2, p. 416—423.
10. Erlinger S., Dhumeaux D. Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes.— *Gastroenterology*, 1974, 66, N 2, p. 281—304.
11. Forker E. L. Mechanisms of hepatic bile formation.— *Amer. Rev. Physiol.*, 1977, 39, N 1, p. 323—347.
12. Lock S., Witschi H., Plaa G. L. The effect of cycloheximide on bile flow in rats.— *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1979, 161, N 3, p. 546—553.
13. Reichen J., Paumgartner G. Relationship between bile flow and Na⁺, K⁺-ATPase in liver plasma membranes enriched in bile canaliculi.— *J. Clin. Invest.*, 1977, 60, N 2, p. 429—434.
14. Tausski H. H., Schorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus.— *J. Biol. Chem.*, 1953, 202, N 2, p. 675—685.
15. Toda G., Oka H., Ikeda Y. Subfraction of rat liver plasma membrane-bound enzymes on the liver cell surface.— *Biochim. et biophys. acta*, 1975, 413, N 1, p. 52—64.
16. Wannagat F. J., Adler R. D., Ockner R. K. Bile acid-induced increase in bile acid-independent flow and plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat liver.— *J. Clin. Invest.*, 1978, 61, N 2, p. 297—307.
17. Wheeler H. O. Secretion in bile.— In: Diseases of the liver. Philadelphia: Lippincott, 1975, p. 87—110.

Институт физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
25.III 1981 г.

ytotoxic se-
l g of body
C-protein
ATPase ac-
time appli-
er 100 g of
the 3d day
ate incorpo-