

10. Рузен-Рунзе Э. Сперматогенез у животных.— М.: Мир, 1980.— 255 с.
11. Ухов Ю. И., Астраханцев А. Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников // Арх. анат., гистол. и эмбриол.— 1983.— 84, № 3.— С. 66—72.
12. Chase David J. Payne Anita H. Changes in Leydig cell function during sexual maturation in the mouse // Biol. Rep.— 1983.— 29, N 5.— P. 1194—1200.
13. Kluin Ph. M., Kramer M. F., de Rooij D. G. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice // Anat. and Embriol.— 1984.— 169, N 1.— P. 73—78.
14. Leblond C. Pand, Clermont J. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the «periodic acid-fuchsin sulfurous acid» technique // Amer. J. Anat.— 1952.— 90, N 2, March.— P. 167—206.
15. Oakberg E. F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium // Ibid.— 1956.— 99, N 3.— P. 507—519.
16. Fogg L. C., Cowing R. T. The changes in cell morphology and histochemistry of the testis following irradiation and their relation to other induced testicular changes // Cancer Res.— 1951.— 11, N 1.— P. 23—28.

Ин-т биологии и биофизики Том. ун-та
М-ва высш. и сред. спец. образования РСФСР

Материал поступил
в редакцию 03.05.89

УДК 612.015.348:547.262

Г. Х. Божко, В. С. Чурсина, П. В. Волошин, В. М. Кулабухов

Влияние этанола на синтез белков в тканях различных органов морских свинок

Хроническая алкоголизация оказывает неблагоприятное влияние на структуру и функцию практически всех тканей изучавшихся органов. Частота морфологических нарушений у больных алкоголизмом (АЛГ) колеблется от 30 % (почки) до 80 % (печень) [6]. Структурные изменения сопряжены с глубокой перестройкой метаболизма. Существенное место в патохимии этанольной интоксикации и АЛГ занимает раздел, посвященный изучению обмена белков в крови и тканях организма, однако данные о влиянии алкоголя на белковый обмен малочисленны по сравнению с данными о влиянии алкоголя на обмен углеводов и липидов [5]. Установлено, что хроническая алкоголизация приводит к уменьшению содержания альбуминов в сыворотке крови или снижению значения отношения концентрации альбуминов к концентрации глобулинов в ней [9]. Вместе с тем не известно, зависит ли это от изменения процессов высвобождения, секреции, синтеза или распада белков. Предполагается, что уменьшение содержания белков в крови вызывается угнетением их новообразования в ткани печени [2]. Однако отдельные этапы поражения печени алкоголем характеризуются накоплением белков [8]. Известно, например, что некоторые фракции сывороточных белков при хроническом действии этанола увеличиваются [4]. Целью нашей работы было исследование длительного влияния этанола на синтез растворимых тканевых белков.

Методика

Донорами крови и тканей служили 20 самцов морских свинок 7-, 8-месячного возраста массой 600 г. Половина из них в течение 3 мес ежедневно получала 30 %-ный раствор этанола (4 г/кг) интрагастрально. Контрольную группу составляли интактные животные, которые находились в условиях лабораторного вивария вместе с животными, подвергавшимися действию алкоголя, и получали одинаковый с ними в качественном и количественном отношении рацион.

Исследовали растворимые белки тканей мозга, печени, сердца, почек и надпочечников. Печень и сердце перфузировали, а другие ткани ополаскивали охлажденным физиологическим раствором, удаляли крупные сосуды и гомогенизировали в 19 объемах

© Г. Х. БОЖКО, В. С. ЧУРСИНА, П. В. ВОЛОШИН, В. М. КУЛАБУХОВ, 1990

0,9 %-ного раствора NaCl. Гомогенаты выдерживали в течение 20 мин при 4 °C для экстракции растворимых белков, после чего центрифугировали. Экстрагированные белки осаждали трихлоруксусной кислотой, тщательно промывали, растворяли в дистиллированной воде и определяли концентрацию белка с помощью модифицированного метода Лоури [11]; 25 мкл раствора белков использовали для электрофоретического их разделения. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах полиакриламидного геля с линейным градиентом концентрации акриламида (2,5—10 %). Условия электрофореза и денситометрии подробно описаны нами ранее [3]. На основании определения количества белков в исследуемых образцах и вычисления по площади пиков денситограммы относительного распределения фракций рассчитывали массовую концентрацию белков.

Интенсивность синтеза белков определяли по включению меченых аминокислот. Для этого животным за 2 ч до начала исследования внутрибрюшинно вводили ^{14}C -белковый гидролизат хлореллы (1,85 МБк/100 г). Окрашенный гель разделяли на 9 зон в соответствии с расположением белковых фракций. Каждый образец помещали во флаконы для подсчета импульсов радиоактивной метки и растворяли в H_2O_2 . После растворения гелей добавляли диоксидный сцинтиллятор и регистрировали удельную радиоактивность, которую выражали числом импульсов радиоизлучения в минуту, испускаемого 1 мг меченого белка каждой фракции ($\text{имп} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$). Статистический анализ проводили с использованием критерия t Стьюдента.

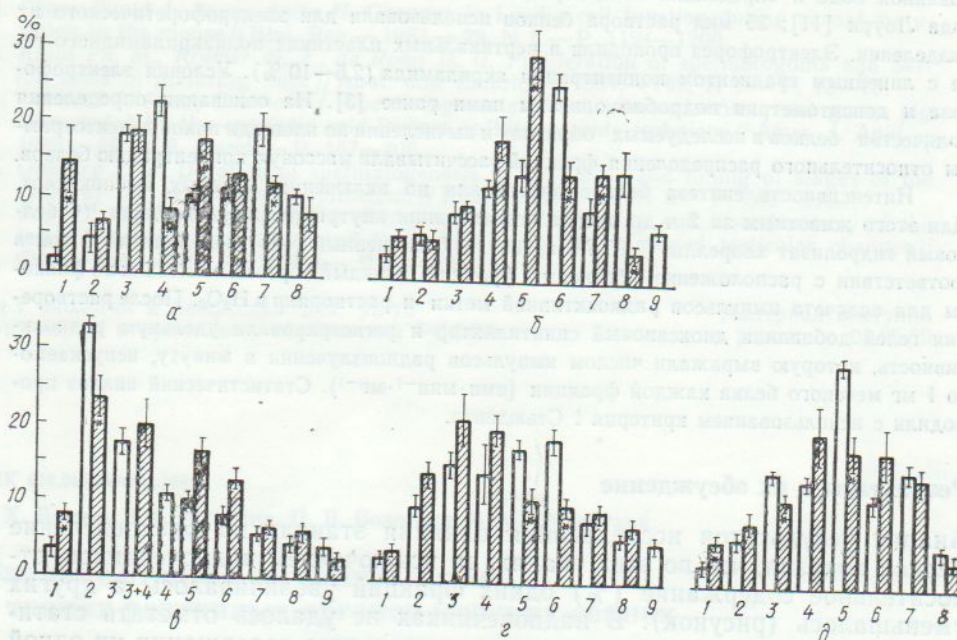
Результаты и их обсуждение

Анализ результатов исследования влияния этанола на распределение белков показал, что во всех тканях, за исключением надпочечников, относительное содержание (%) одних фракций увеличивалось, а других уменьшалось (рисунок). В надпочечниках не удалось отметить статистически достоверного увеличения относительного содержания ни одной из исследуемых фракций. Мозг, печень и почки характеризовались возрастанием доли высокомолекулярных белков, расположенных на электрофореграмме в стартовой зоне геля. В других тканях наблюдалось увеличение содержания более подвижных при электрофорезе фракций. Характерная особенность изменения содержания полипептидов состояла в том, что увеличение концентрации белков какой-либо зоны сопровождалось, как правило, уменьшением доли соседних или близко расположенных фракций. Этот факт дает основание предположить, что количественное перераспределение растворимых белков в тканях различных органов у животных под влиянием этанола обусловлено их агрегацией. В пользу этого предположения свидетельствует также отсутствие в сердце и надпочечниках опытной группы животных наиболее подвижных низкомолекулярных фракций. В печени действие этанола сопровождалось объединением фракций «3» и «4» в одну полосу электрофореграммы. Наиболее четкое перераспределение белков за счет уменьшения низкомолекулярных пептидов наблюдалось в сердце. Последняя фракция в белковом спектре отсутствовала, а предыдущая уменьшалась почти в 4 раза.

Данные литературы позволяют судить о том, что механизм агрегации может быть обусловлен несколькими причинами. Прежде всего следует отметить свойство этанола денатурировать белки, поскольку нарушение их макромолекулярной структуры неизбежно связано с процессами агрегации [16]. Известно, что длительная интоксикация этанолом сопровождается накоплением в тканях ацетальдегида. Этот продукт окисления этанола интенсивно модифицирует белки крови и тканей и вызывает образование крупных высокомолекулярных комплексов в результате межмолекулярных сшивок полипептидов [1, 2].

Действие этанола на количественные изменения суммарных белков тканей, а также индивидуальных полипептидов, неоднозначно и, согласно данным литературы, варьирует в широких пределах [2]. Такая вариабельность изменения содержания белков связана, по-видимому, с неспецифическими опосредованными эффектами этанола на многие этапы трансляции и транскрипции. Большое значение имеет то обстоятельство, что в условиях интоксикации этанолом наблюдается измене-

ние скорости катаболизма и секреции тканевых белков [8]. Полученные нами результаты показывают, что колебания количества белка в отдельных фракциях могут вызываться влиянием этанола на процессы агрегации.



Влияние этанола на изменение относительного содержания электрофоретических фракций белков (1—9) в тканях различных органов морских свинок:
а — мозг; б — сердце; в — надпочечники; г — почки (белые столбики — контроль, заштрихованные — опыт; звездочка внутри столбиков — статистически значимые изменения по сравнению с контролем).

Как видно из таблицы, эффект этанола заключается в снижении включения меченых аминокислот в белки тканей всех исследуемых органов. Суммарная удельная радиоактивность всех белковых фракций у опытной группы животных, выраженная в процентах контрольной,

Интенсивность синтеза белков в тканях разных органов морских свинок при длительном действии этанола (в белковых фракциях)

Условие эксперимента	Абсолютная удельная радиоактивность каждой из белковых фракций			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Ткань мозга				
животных, не получавших этанол	82,0±30	69,3±14	23,0±4	6,3±0,1
животных, получавших этанол	5,2±1*	26,7±3*	5,3±2*	13,0±1*
Ткань печени				
животных, не получавших этанол	25,6±6	4,0±1	3,3±0,7	10,9±3
животных, получавших этанол	8,0±1*	2,8±1	4,4±1,3	4,4±1,3
Ткань сердца				
животных, не получавших этанол	3,6±2	36,9±8	18,8±3	12,9±3
животных, получавших этанол	12,0±2*	13,7±2*	7,9±2*	4,2±1*
Ткань почек				
животных, не получавших этанол	55,0±12	32,2±8	9,7±2	13,1±3
животных, получавших этанол	10,7±1*	7,4±2*	5,8±2	4,8±1*
Ткань надпочечников				
животных, не получавших этанол	31,9±7	7,5±1	6,4±1	7,8±2
животных, получавших этанол	8,8±2*	1,8±1*	1,5±1*	1,5±1*

Примечания: в статистическом показателе ($\bar{x} \pm \bar{Sx}$) « $\bar{x}$ » — среднее арифметическое, « $\bar{Sx}$ » — среднее составляет 9; увеличение номера (1-я—9-я) электрофоретической фракции белков идет в направлении изменения.

колебалась от 51,2 % до 24,9 %. Наибольшее угнетение отмечалось в почках, что указывает на высокую чувствительность ткани этого органа к токсическому действию этанола. Статистически значимое уменьшение удельной радиоактивности наблюдалось в пяти из 8—9 регистрируемых фракций в тканях мозга, сердца, почек и надпочечников. Лишь одна из белковых фракций в мозгу и сердце характеризовалась увеличением синтеза белков. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что (за редким исключением) длительное действие этанола приводит к угнетению новообразования фракций растворимых белков в тканях исследуемых органов.

Это заключение согласуется с данными о снижении синтеза альбумина и других растворимых белков в присутствии этанола в перфузируемой печени кроликов [10, 12]. Синтез белков в ткани сердца снижался на 15—20 % [15]. Особенно сильное ингибирующее действие этанола оказывал на слизистую оболочку желудка [13]. В ткани мозга эффект хронической алкоголизации находился в зависимости от дозы и времени введения этанола. В том случае, если животные получали 3 г/кг или больше этанола, синтез белков угнетался. Введение 1,2 г/кг этанола приводило к повышению включения меченых предшественников в белки мозга [14]. Синтез белков стимулировался через 1—2 нед ежедневного введения этанола, однако в последующем наблюдалось его снижение [15].

Получены данные, свидетельствующие о том, что в ядрах клеток печени при длительной интоксикации этанолом угнетается синтез белков хроматина (нерастворимых белков). По многим признакам результат действия этанола на хроматиновые белки подобен результату действия классических ингибиторов белкового синтеза [7]. При сравнении механизмов влияния этанола и циклогексимида на новообразование растворимых белков в ткани печени также обнаруживаются черты сходства [12]. Эти данные убедительно свидетельствуют в пользу того, что в отношении ткани печени этанол вполне можно рассматривать как типичный интегральный ингибитор белкового синтеза.

На основании результатов проведенной нами работы и данных литературы можно заключить, что механизмы патогенеза хронической этаноловой интоксикации и АЛГ могут включать количественное перераспределение растворимых белков и угнетение их синтеза в тканях

на организм животных этанола (по результатам измерения удельной радиоактивности

фракций в отдельности ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), $\times 10^{-3}$ имп·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹					Относительная удельная радио- активность всех белковых фракций в сумме, % конт- рольной
5-й	6-й	7-й	8-й	9-й	
16,9±4 5,4±1*	16,0±5 2,9±3	14,2±4 9,4±3	20,2±4 13,5±3	— —	32
8,9±3 5,7±1	28,5±5 6,8±2*	24,1±7 12,2±2	25,1±4 10,7±2*	22,4±7 27,7±7	51
15,2±4 4,2±1*	9,1±3 11,2±3	17,9±4 5,6±1*	13,0±6 —	37,5±13 —	36
5,4±2 4,7±1	13,7±4 3,0±1*	11,6±2 5,8±0,8*	28,3±9 —	— —	25
6,7±2 3,1±1	6,5±2 2,6±1	11,7±2 5,1±1*	18,5±5 10,5±1	15,5±3 —	31

± квадратичная ошибка среднего арифметического; среднее число проб в каждом контроле и опыте
* — от катода к аноду; звездочкой обозначено статистически значимое по сравнению с конт-

различных органов. Таким образом, хроническое действие этанола на ткани мозга, печени, почек и сердца вызывает перераспределение электрофоретических фракций растворимых белков, что, возможно, связано с их агрегацией; длительное введение этанола вызывает уменьшение суммарной удельной радиоактивности в пяти из 8-9 регистрируемых электрофоретических фракций растворимых белков в тканях исследуемых органов. Вместе с тем одна из всех белковых фракций, полученная из тканей мозга и сердца, характеризуется увеличением радиоактивности аминокислот.

G. Kh. Bozhko, V. S. Chursina, P. V. Voloshin, V. M. Kulabukhov

THE INFLUENCE OF ETHANOL ON SYNTHESIS OF PROTEINS IN TISSUES OF DIFFERENT ORGANS OF GUINEA PIGS

Long-term administration (for three months) of ethanol has been studied for its effect on the composition and synthesis of electrophoretic fractions of soluble proteins of the liver, brain, heart, kidneys and adrenals tissues in the guinea pigs. The obtained data permit supposing that the quantitative redistribution of the fractions under study as influenced by ethanol is due to their aggregation. Most of the studied tissues demonstrate a decrease in specific radioactivity of total proteins and 5 of 8-9 recorded electrophoretic fractions. Only one fraction in the heart and brain has been characterized by an increase of the protein synthesis level. The authors' results and data from literature make it possible to conclude that while analyzing pathogenesis of the chronic intoxication by ethanol and alcoholism the quantitative redistribution of soluble proteins and suppression of their synthesis in various tissues should be taken into account.

V. P. Protopopov Research Institute of Neurology and Psychiatry,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kharkov

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божко Г. Х., Волошин П. В. Действие этанола на белки тканей и сыворотки крови в организме человека и животных // Успехи совр. биологии.— 1989.— 108, N 1 (4).— С. 52—65.
2. Божко Г. Х., Хоменко Е. И. Сравнение взаимодействия этанола и ацетальдегида с компонентами хроматина ядер клеток печени крыс // Вопр. мед. химии.— 1988.— 34, N 2.— С. 19—23.
3. Кулабухов В. М., Волошин П. В., Костюковская Л. С. Изменение белкового состава сыворотки крови при экспериментальной гиперхолестеринемии // Укр. биохим. журн.— 1987.— 59, N 2.— С. 27—33.
4. Кулабухов В. М., Волошин П. В., Божко Г. Х. Белки сыворотки крови при интоксикации этанолом и холестеринозе // Там же.— 1987.— 59, N 6.— С. 19—23.
5. Островский Ю. М., Сатановская В. И., Садовник М. Н. Биологический компонент в генезе алкоголизма.— Минск: Наука и техника.— 1986.— 324 с.
6. Серов В. В., Лебедев С. П. Клиническая морфология висцерального алкоголизма // Вестн. АМН СССР.— 1988.— № 3.— С. 48—53.
7. Хоменко Е. И., Божко Г. Х. Влияние этанола на синтез хроматиновых белков ядер клеток печени крыс // Укр. биохим. журн.— 1984.— 56, N 2.— С. 191—194.
8. Rusis L., Csabai G., Fodor M. Increase of alcohol dehydrogenase and protein content of liver following chronic ethanol administration // FEBS Lett.— 1985.— 183, N 1.— P. 143—144.
9. Dreux S., Labrouace F., Nalpas B. Proteines plasmatiques et complications hepaticque dans l'alcoholisme chronique // Ann. Biol. Clin.— 1985.— 43, N 4.— P. 628—629.
10. Lakshmanan M. R., Ezekiel M. Effect of chronic ethanol feeding upon the catabolism of protein and lipid moieties of chylomicrons and very low density lipoproteins in vivo and in the perfused heart system // Alcoholism.— 1985.— 9, N 4.— P. 327—331.
11. Miller G. L. Protein determination for large number of samples // Anal. Chem.— 1959.— 31, N 5.— P. 964—966.
12. Rothschild M. A., Oratz M., Schreiber S. S. The effect of ethanol and hyperosmotic perfusates on albumin synthesis and release // Hepatology.— 1986.— 6, N 6.— P. 1382—1385.
13. Spohn M., McColl I. Ethanol, its effect on the synthesis of proteins by guinea — pig gastric mucosa // Biochem. Pharmacol.— 1986.— 35, N 11.— P. 1909—1914.
14. Wallin B., Merland J., Fikke A. Combined effects of ethanol and pH-change on protein synthesis in isolated rat hepatocytes // Acta pharmacol. et toxicol.— 1981.— 49, N 2.— P. 134—140.

15. Ward L. C. Ethanol and protein and amino acid metabolism in heart // Int. J. Biochem.—1987.—19, N 10.—P. 887—897.
16. Wickramasinghe S. N., Cardner B., Barden G. Circulating cytotoxic protein generated after ethanol consumption: identification and mechanisms of reaction with cells // Lancet.—1987.—N 8551.—P. 122—126.

Харьков. науч.-исслед. ин-т неврологии
и психиатрии М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил
в редакцию 15.12.89

УДК 612.112.93:612.112.94:616—006—092.4/9

В. В. Овсиенко, И. С. Никольский

Диссоциация мастолимфоцитарных розеток

Некоторые типы лимфоцитов при контакте с тучными клетками образуют *in vitro* мастолимфоцитарные розетки (МЛР) — ассоциации клеток, состоящие из тучной клетки, присоединившей три и более лимфоцитов [1, 5, 6]. Способность лимфо- и мастоцитов к контактному взаимодействию претерпевает изменения при активации и дифференцировке клеток, их злокачественной трансформации, а также при иммунологических реакциях и опухолевом процессе [2, 4, 7], что предполагает участие исследуемой формы взаимодействия масто- и лимфоцитов в функционировании системы иммунитета. Тем не менее, значение и характер указанных межклеточных контактов остаются неясными и требуют изучения.

В этой статье сообщается о необратимой диссоциации МЛР и факторах, влияющих на этот процесс.

Методика

Получение тучных клеток и лимфоцитов крыс, а также постановку реакции образования МЛР осуществляли по ранее описанной методике [3]. Клетки тимуса ($5 \cdot 10^6$) и тучные клетки ($5 \cdot 10^4$) смешивали в 1,0 мл среды 199, центрифугировали при 250 *g* в течение 5 мин, осадок ресуспендировали, подсчитывали число МЛР, которые затем инкубировали 1—2 ч при температуре либо 4 °С, либо 37 °С. При постановке реакции использовали только аутологичные клетки. Для каждой крысы определяли исходное число МЛР — относительное число (%) розеток, образованных мастоцитами ($5 \cdot 10^4$) и тимоцитами ($5 \cdot 10^6$) этого животного непосредственно после получения клеток и центрифугирования. Число находящихся в суспензии МЛР в одной и той же пробе через 1 и 2 ч инкубации оценивали по индексу, вычисляемому делением относительного числа (%) розеток, наблюдаемого в каждой пробе через определенный промежуток времени от начала инкубации, на относительное число (%) розеток, наблюдаемое до инкубации МЛР. Способность клеток к образованию МЛР после инкубации в указанных условиях определяли следующим образом. Через 2 ч инкубации клетки ресуспендировали, центрифугировали при 250 *g* в течение 5 мин, надосадочную жидкость отбирали и клетки вновь ресуспендировали в 1,0 мл среды 199, после чего производили подсчет МЛР.

Аналогичные манипуляции проводили с розетками, образованными лимфоцитами периферической крови человека и эритроцитами барана — Е-розетками, полученными по ранее описанной методике [8].

Результаты и их обсуждение

Число Е-розеток, находящихся в суспензии, после инкубации при 4 °С в течение 2 ч практически не изменялось, но после инкубации при 37 °С наблюдалась почти полная диссоциация розеток. При повторном осаж-

© В. В. ОВСИЕНКО, И. С. НИКОЛЬСКИЙ, 1990.