

Динаміка розподілу ^{14}C -етанолу та ^{14}C -ацетальдегіду в сім'яниках щурів

В течение суток исследовали изменение радиоактивности после введения животным ^{14}C -этанола и ^{14}C -ацетальдегида в общих белках, кариоплазме и хроматине ткани семенников и сыворотке крови крыс. В одной из серий опытов динамику включения ацетальдегида определяли на фоне действия дисульфирама. Обнаружили, что скорость элиминации из сыворотки индикаторных доз этанола и ацетальдегида в отдельные промежутки времени в течение суток различна. В интервале 2—4 ч наблюдалась более высокая скорость утилизации этанола, чем ацетальдегида. Это, вероятно, связано с активностью ферментов превращения этанола, интенсивным его окислением и поступлением продуктов превращения в ткани. Среди исследованных структур семенников наибольшим уровнем радиоактивности характеризуется кариоплазма. В течение суток скорость накопления ацетальдегида, приведенная к единице времени, в хроматине в несколько раз меньше чем в кариоплазме. На основании этих результатов можно предположить, что структуры кариоплазмы семенников располагают механизмами, которые задерживают проникновение ацетальдегида в хроматин мужских генеративных клеток.

Вступ

Токсична дія етанолу пов'язана з порушенням функції генеративних клітин [3, 4]. Це витікає з даних щодо морфологічних і функціональних змін у нашалків хворих на алкоголь, виникнення хромосомних aberracій, транслокаційних перебудов і перицентричних інверсій, пригнічення біосинтезу білків і нуклеїнових кислот внаслідок інтоксикації етанолом [5]. Порушення функції чоловічих генеративних клітин відбувається пригніченням на початкових стадіях сперматогенезу [7]. У хворих на алкоголь зменшена кількість сперматозоїдів та їх рухливість [9], спостерігаються аномальні форми, у 2,5 разів щонайчастіше зустрічаються нестиглі клітини [11].

Механізми негативних ефектів алкоголю можуть бути опосередкованими або полягати у прямій дії на тестикули. Важливо з цієї причини дослідити інтенсивність включення етанолу та ацетальдегіду в структури клітин сім'яників. Це більш актуально, оскільки є підстави гадати, що метаболізм етанолу і дія його на синтез білків може відрізнятися у гонадах порівняно з іншими тканинами [6, 10].

Метою нашої роботи було дослідження динаміки розподілу міченого етанолу та ацетальдегіду в сім'яниках щурів.

Методика

Досліди проводили на 63 безпородних самцях білих щурів масою 200—250 г. Тварин розділили на три групи. Одній з них внутрішньочеревинно вводили індикаторні дози ^{14}C -етанолу — 2 МБк/100 г, другій — таку ж кількість ^{14}C -ацетальдегіду. Питома випромінюваність препаратів етанолу

та ацетальдегіду була одинаковою, та вони одержували ^{14}C -ацетальдегід. Групу контролю вводили внутрішньочеревинно у сусpenзії 1 % крохмалю.

Сироватку крові отримали протягом 15 хв при фізіологічного розчину та за гальновживані засоби заспокоювання. Трації сумарних білків десуберніованого розчину трихлороцтової кислоти промивали трихлороцетоном, підраховували їх випромінювання водою, ефіром і розчинами.

Ядра та хроматин отримані методу [1]. Хроматин який містив 5 моль/л сечі карбонату калію та хроматин діалізували добу супроти змінами. Всі операції проводили в реакторах.

Випромінюваність і випромінювання реестрували через 0,5; 2,0; 4,0 та ацетальдегіду [8]. У кожну групу випромінювали 5 тварин. Випромінювання вимірювали числом імпульсів за одиницю часу.

Одержані результати обробляли статистичними методами.

Результати та їх обговорення

Відповідно до результатів випромінюваності етанолу та ацетальдегіду



Рис. 1. Динаміка питомої радіоактивності сироватки крові щурів при введенні фоні дисульфіраму. По вертикальній осі — випромінювання від 0,5 до 5.000.000. По горизонтальній — час від 0 до 24 год.

ацетальдегіду

тивности после введения
щих белков, кариоплазме
и крыс. В одной из серий
еляли на фоне действия
ции из сыворотки ин-
льные промежутки врем-
-4 ч наблюдается более
льдегида. Это, вероят-
ния этанола, интенсив-
превращения в ткани.
ьшим уровнем радиоак-
чес суток скорость на-
ремени, в хроматине в
овании этих результа-
лазмы семенников рас-
роникновение ацеталь-

функції генеративних

і функціональних
хромосомних аберрацій,
інверсій, пригнічення
інтоксикації етанолом
клітин відбувається
[7]. У хворих на ал-
рухливість [9], спо-
тіше зустрічаються не-

ти опосередкованими
цієї причини дослідити
в структури клітин
гадати, що метаболізм
у гонадах порівняно
з поділу мічених ета-

шурів масою 200—
нутрішньочеревинно
г, другій — таку ж
препаратів етанолу

та ацетальдегіду була однаковою — 10 МБк/мл розчину. Третя група тварин одержувала ^{14}C -ацетальдегід на фоні дисульфіраму, який попередньо вводили внутрішньочеревинно за три доби перед ацетальдегідом по 0,2 г/кг у супензії 1 % крохмалю.

Сироватку крові отримували після її центрифугування при 2000 об/хв протягом 15 хв при 4°C. Тестикули поміщали до охолодженого фізіологічного розчину та видаляли зовнішню оболонку. Застосовували загальновживані засоби знеболювання та автоназії. Для визначення концентрації сумарних білків деяку частину тканини гомогенізували у 5 %-му розчині трихлороцтової кислоти та центрифугували при 2000 об/хв. Осад тричі промивали трихлороцтовою кислотою. Супернатанти з'єднували та підраховували їх випромінюваність. Потім осад промивали дистильованою водою, ефіром і розчиняли в H_2O за підлужування.

Ядра та хроматин одержували з клітин см'янників за умов описаного раніше методу [1]. Хроматин сусpenдували в *tris-HCl* буфері, pH 8,0, який містив 5 моль/л сечовини та 2 моль/л хлориду натрію. Препаратори каріоплазми та хроматину перед визначенням випромінюваності діалізували добу супроти 200 об'ємів дистильованої води з декількома змінами. Всі операції проводили при температурі 4°C.

Випромінюваність і концентрацію білка у досліджуваних зразках реєстрували через 0,5; 2,0; 4,0 і 24 год після введення опромінених етанолу та ацетальдегіду [8]. У кожний з зазначених періодів часу досліджували по 5—6 тварин. Випромінювання вимірювали на лічильнику Бета-1 і виражали числом імпульсів випромінювання за хвилину на 1 кмг білка.

Одержані результати опрацьовували, користуючись загально вживаними статистичними методами.

Результати та їх обговорення

Відповідно до результатів наведених на рис. 1 слід вважати, що зміни випромінюваності етанолу та ацетальдегіду спричинені відмінною активністю

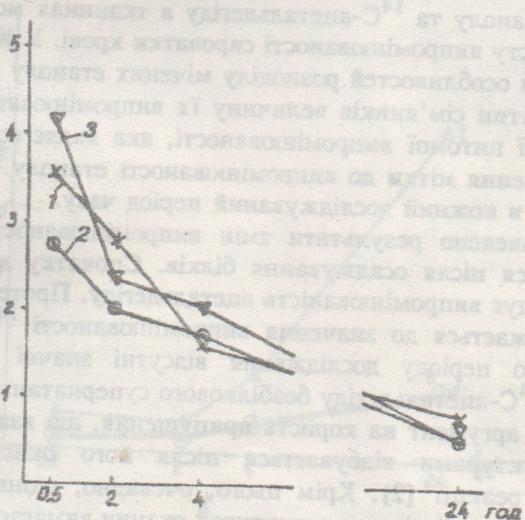


Рис. 1. Динаміка питомої радіоактивності ^{14}C -станолу та ^{14}C -ацетальдегіду ($\text{імп}/\text{хв} \times 10^{-3}$) си-
роватки крові шурів при введенні Ім: 1 — етанолу, 2 — ацетальдегіду, 3 — ацетальдегіду на
фоні дисульфіраму. По вертикалі: питома радіоактивність, по горизонталі: час дослідження,
год.

Таблиця 1. Швидкість елімінації ($\text{імп} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$) $\times 10^{-3}$ індикаторних доз етанолу та ацетальдегіду в окремі відрізки часу протягом доби (М±m).

Препарат	Інтервал часу, год			
	0,5—2	2—4	4—24	6,5—24
Етанол	6,4±0,5	5,7±0,5	0,4±0,03	1,26±0,05
Ацетальдегід	5,5±0,5	1,6±0,1	0,5±0,03	0,94±0,05
Ацетальдегід на фоні дисульфіраму	11,7±0,7	2,1±0,1	0,7±0,05	1,54±0,06

Таблиця 2. Випромінюваність ^{14}C безбілкового супернатанту ($\text{імп}/\text{хв}$ на 1 мг білка) $\times 10^{-3}$ тканини сім'янок при введенні ^{14}C -етанолу та ^{14}C -ацетальдегіду (М±m).

Препарат	Термін дослідження, год			
	0,5	2,0	4,0	24,0
Етанол	52±4	27±2	14±1	11±1
Ацетальдегід	13±1	13±1	12±1	5±0,5
Ацетальдегід на фоні дисульфіраму	10±1	20±2	10±1	15±1

алкоголь- та альдегіддегеназ крові, оскільки вони відсутні при введенні тваринам ацетальдегіду на фоні дисульфіраму, інгібітора ацетальдегіддегеназ.

Аналіз результатів наведених у табл. 1 дозволяє припустити, що у відрізок часу 2—4 год відбувається щонайбільш інтенсивне окислення етанолу та надходження продуктів його перетворення до тканин. Динаміка розподілу ^{14}C -етанолу та ^{14}C -ацетальдегіду в тканинах може бути залежною від змін вмісту випромінюваності сироватки крові. У зв'язку з цим для коректної оцінки особливостей розподілу мічених етанолу та ацетальдегіду в структурах клітин сім'янок величину їх випромінюваності надавали у вигляді відносної питомої випромінюваності, яка являє собою відношення величини включення мітки до випромінюваності етанолу та ацетальдегіду сироватки крові в кожний досліджуваний період часу.

У табл. 2 наведено результати змін випромінюваності супернатанту, який залишається після осаджування білків. Спочатку випромінюваність етанолу перевищує випромінюваність ацетальдегіду. Проте через 4 год його значення наближається до значення випромінюваності ^{14}C -ацетальдегіду. Протягом усього періоду дослідження відсутні значні коливання випромінюваності ^{14}C -ацетальдегіду безбілкового супернатанту. Цей результат слід визнати як аргумент на користь припущення, що взаємодія етанолу з білковими структурами відбувається після його окиснення внаслідок дегідрогеназної реакції [2]. Крім цього, очевидно, оцінка динаміки розподілу випромінюваної мітки в структурах тканин вимагає врахування змін її величини в супернатанті. Тому наступні результати наведено у вигляді відношення величини випромінюваності ядерних структур і загальних білків до випромінюваності безбілкового екстракту в кожний досліджуваний відрізок часу.

Рис. 2. Зміни радіоактивності ^{14}C -етанолу (а) та ^{14}C -ацетальдегіду (б) в каріоплазмі сім'янок пшениці (3) та сумарні білки (4) випромінюваності ($\text{імп}/\text{хв}$ на 1 мг білка) $\times 10^{-3}$, по горизонталі: логарифм

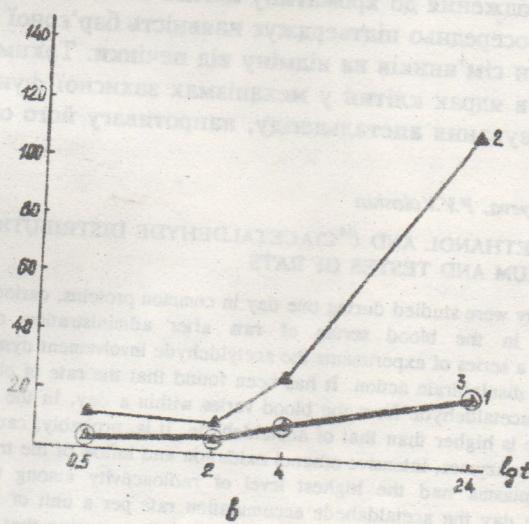
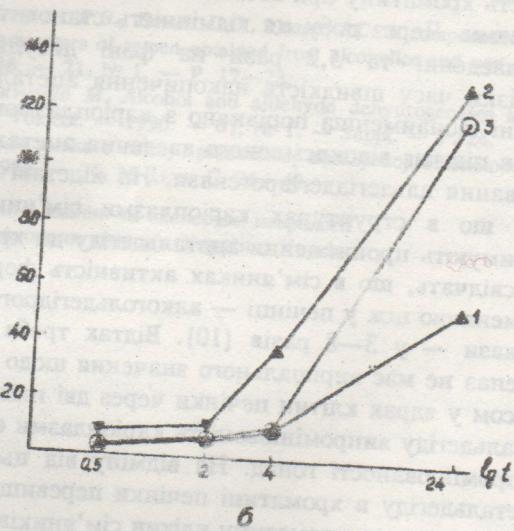
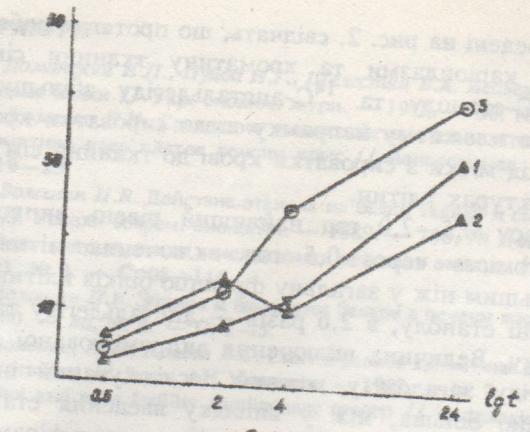


Рис. 2. Зміни радіактивності ^{14}C -етанолу та ^{14}C -ацетальдегіду структур сім'янників щурів при введенні: а — етанолу, б — ацетальдегіду на фоні дисульфіраму (1 — хроматин, 2 — каріоплазма, 3 — сумарні білки). По вертикальній осі: питома радіактивність (ImP/xh на 1 mg білка) $\times 10^{-3}$; по горизонтальній: логарифм часу, год.

Результати, наведені на рис. 2, свідчать, що протягом доби в препаратах сумарних білків, каріоплазми та хроматину тканини сім'янників випромінюваність ^{14}C -етанолу та ^{14}C -ацетальдегіду збільшувалася, тобто змінювалася у протилежному напрямку щодо сироватки крові. Отже спостерігається перехід мітки з сироватки крові до тканини сім'янників і накопичення її в структурах клітин.

В інтервалі часу 0,5—2,0 год найвищий рівень випромінюваності в каріоплазмі. Натомість через 0,5 год включення мітки в структури каріоплазми є більшим ніж у загальну фракцію білків клітин сім'янників: на 60 % при введенні етанолу, в 2,6 разів — ацетальдегіду та в 4,2 рази на фоні дисульфіраму. Величина включення випромінюваної мітки при введенні ацетальдегіду загалом у кожний досліджуваний інтервал часу в каріоплазмі значно більша, ніж у випадку введення етанолу. Набагато чіткіше ця закономірність виявляється на фоні дисульфіраму.

Випромінюваність хроматину при введенні ацетальдегіду є набагато меншою ніж каріоплазми. Через добу ця відмінність становить 2,5 разів при відокремленому введенні та 5,2 рази на фоні дисульфіраму. В усі досліджувані відрізки часу швидкість накопичення ацетальдегіду за одну годину в хроматині щонайменша порівняно з каріоплазмою: у середньому за добу в 2,5 разів під час відокремленого введення ацетальдегіду та в 6,1 разів умов інгібування альдегіддегідрогенази. На підставі цих результатів слід припустити, що в структурах каріоплазми сім'янників наявні механізми, які затримують проникнення ацетальдегіду до хроматину клітин. Дані літератури свідчать, що в сім'янниках активність ферментів перетворення етанолу є меншою ніж у печінці — алкогольдегідрогенази у 30 разів, альдегіддегідрогенази — у 3—8 разів [10]. Відтак треба думати, що активність дегідрогеназ не має вирішального значення щодо функції цих механізмів. Тим часом у ядрах клітин печінки через дві години після введення міченого ацетальдегіду випромінюваність каріоплазми є порівняною щодо величини випромінюваності гонад. На відміну від цього інтенсивність накопичення ацетальдегіду в хроматині печінки перевищує у 10 разів величину його надходження до хроматину клітин сім'янників [2]. Зіставлення цих результатів посередньо підтверджує наявність бар'єрної функції саме в каріоплазмі клітин сім'янників на відміну від печінки. Таким чином, можна передбачити, що в ядрах клітин у механізмах захисної функції переважають процеси зв'язування ацетальдегіду, напротивагу його окисленню.

G.Kh.Bozhko, V.S.Krayeva, P.V.Yoloshin

DYNAMICS OF ^{14}C ETHANOL AND ^{14}C ACETALDEHYDE DISTRIBUTION IN THE BLOOD SERUM AND TESTES OF RATS

Changes in radioactivity were studied during one day in common proteins, carioplasma and chromatin of testis tissue and in the blood serum of rats after administration of ^{14}C ethanol and ^{14}C acetaldehyde. In a series of experiments the acetaldehyde involvement dynamics was determined on the background of disulphiram action. It has been found that the rate of elimination of indicator doses of ethanol and acetaldehyde from the blood varies within a day. In the interval (2—4 h) the ethanol utilization rate is higher than that of acetaldehyde. It is, probably, caused by the activity of ethanol transformation enzymes, intensive ethanol oxidation and inflow of the transformation products to the tissues. Carioplasma had the highest level of radioactivity among the investigated testis structures. During the day the acetaldehyde accumulation rate per a unit of time was several times lower in chromatin, than in carioplasma. These results permit supposing that the testis carioplasma structures possess the mechanisms which inhibit acetaldehyde penetration into chromatin of the male generative cells.

Ukrainian Institute of Clinical and Experimental Neurology and Psychiatry, Ministry of Public Health of Ukraine, Kharkov

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Божко Г.Х., Доманський Е.Л. Білки-негистонові білки // Труди...
2. Божко Г.Х., Хоменка Е.Л. Состав компонентами хроматина ядер...
№ 2. — С. 19—23.
3. Божко Г.Х., Волошин П.В. Білки животных // Успехи современной...
4. Божко Г.Х. Роль ацетальдегіду в метаболизме алкоголя // Алкоголь...
— 1990. — 21, № 3. — С. 1—10.
5. Божко Г.Х., Волошин П.В. Закономерности накопичения ацетальдегіду в...
6. Божко Г.Х., Волошин П.В. Ацетальдегід в метаболизме алкоголя // Алкоголь...
7. Brzek A. Alcohol and male fertility // Alcohol and Reproduction. — 1986. — P. 32—36.
8. Miller G.L. Protein determinants of alcohol sensitivity // Alcohol and...
№ 5. — P. 964—966.
9. Nagy F., Pendergrass P.B., Eberle J. Physiological parameters of sexual...
Alcohol. — 1986. — 21, № 1. — P. 1—10.
10. Rout U.K., Koivusalo M. Acetaldehyde dehydrogenase in rat liver // Brit. J. Pharmacol. and Toxicol. — 1986. — 88, № 1. — P. 1—10.
11. Sosnik H. Gonada meska w ochronie przed alkoholem // Roczniki Medyczne. — 1986. — 37, № 1. — P. 1—10.

Укр. наук.-дослід. ін-т клініч. та
та психіатрії М-ва охорони здоров'я

доби в препаратах і сім'янників вип'ятувалася, тобто і крові. Отже спо-сім'янників і нако-

шроміюваності в тки в структурні тин сім'янників: на та в 4,2 рази на ої мітки при вве-інтервал часу в танолу. Набагато

у є набагато мен-іть 2,5 разів при тьфіраму. В усі льдегіду за одну ю: у середньому льдегіду та в 6,1 цих результатів иків наявні ме-юматину клітин. рментів перетво-енази у 30 разів, думати, що ак-функції цих ме-ни після введен-порівняною що-то інтенсивність у 10 разів ве-2]. Зіставлення функції саме в чином, можна кінці переважа-кисленню.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Божко Г.Х., Доманський Н.П., Пуйда Н.Г., Шелестин В.А. Исследование комплекса гистоны-негистоновые белки // Укр. биохим. журн. — 1978. — 50, № 5. — С. 621—626.
2. Божко Г.Х., Хоменко Е.И. Сравнение взаимодействия этанола и ацетальдегида с компонентами хроматина ядер клеток печени крыс // Вопросы мед. химии. — 1988. — 34, № 2. — С. 19—23.
3. Божко Г.Х., Волошин П.В. Действие этанола на белки тканей и сыворотки крови человека и животных // Успехи соврем. биологии. — 1989. — 108, № 1(4). — С. 52—65.
4. Божко Г.Х. Роль ацетальдегида в механизмах действия этанола // Успехи физiol. наук. — 1990. — 21, № 3. — С. 98—116.
5. Божко Г.Х., Волошин П.В. Этанол и биосинтез белков в печени животных // Вопросы мед. химии. — 1990. — 36, № 4. — С. 2—5.
6. Божко Г.Х., Волошин П.В., Краєва В.С. Синтез белков хроматина ядер клеток тканей крыс при действии этанола // Докл. АН України. — 1992. — № 7. — С. 149—152.
7. Brzek A. Alcohol and male fertility (preliminary report) // Andrologia. — 1987. — 19, № 1. — P. 32—36.
8. Miller G.L. Protein determination for large number of samples // Anal. Chem. — 1959. — 31, № 5. — P. 964—966.
9. Nagy F., Pendergrass P.B., Bowen D.C., Yeager J.C. A comparative study of cytological and physiological parameters of semen obtained from alcoholics and non-alcoholics // Alcohol and Alcohol. — 1986. — 21, № 1. — P. 17—23.
10. Rout U.K., Kaivusalo M. Alcohol and aldehyde dehydrogenases in rat testis and liver // Pharmacol. and Toxicol. — 1990. — 67, № 1. — Suppl. — P. 24.
11. Sosnik H. Gonada meski w ostrej i przewlekłej intoksykacji alkoholowej. II. Spermatogenesza // Patol. pol. — 1986. — 37, № 1. — С. 26—40.

Укр. наук.-дослід. ін-т клініч. та експерим. неврології та психіатрії М-ва охорони здоров'я України, Харків

Матеріал наданий до редакції 28.06.93