

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СУММАРНОГО БЕЛКА В ГЕПАТОЦИТАХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ У КРЫС

Ю.А. МАГАКЯН, Е.М. КАРАЛЮВА, Л.А. АКОНЯН, П.А. ГАБРИЭЛЯН, А.С. КАПАЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван, 375044

Панкреатит - гепатоциты - полиплоидия - белок - ДНК

В одной из работ [9] с помощью цитофотометрии гепатоцитов крысы было показано, что при экспериментальном остром панкреатите (ЭОП) их распределение в популяции по содержанию ДНК и плотности изменяется в связи со сменой ситуаций на разных этапах ЭОП. Возрастает количество полиплоидных и двуядерных клеток (что является одним из проявлений гиперрепликации ДНК [5]), обладающих повышенной устойчивостью к действию патогенных факторов. Увеличение их числа ускоряет процесс адаптации популяции к изменившимся условиям. Между тем известно, что гиперрепликация ДНК в любом своем проявлении способствует интенсификации синтеза и накопления белков (в их числе специфических) в клетках [5]. Естественно было предположить, что и в данном случае это могло быть связано с более высокой активностью их синтеза и накопления в таких клетках. Для решения этого вопроса был проведен цитофотометрический анализ содержания суммарного белка в гепатоцитах на разных стадиях развития ЭОП, причем количество белка и ДНК определяли в одних и тех же клетках одновременно. Результаты этого исследования приводятся в данном сообщении. Подобные сведения, вместе с полученными нами ранее, значительно расширяют и углубляют представления о природе защитных и восстановительных процессов в печени при ЭОП.

Материал и методика. У белых крыс весом 200 г в дуоденальном сегменте поджелудочной железы (ПЖ) индуцировали ЭОП путем охлаждения ее селезеночного сегмента хлороформом. Через 6 ч, а затем на 1, 3, 7, 14, 20, 21, 22 и 30 сутки крысы забивали (по 5 голов на каждый срок) и кусочки печени фиксировали в смеси этилэстера уксусной кислоты (3:1) и 2%-ного формалина. Парафиновые срезы (5 мкм) для одновременного выявления ДНК и суммарного белка окрашивали фуксином по Фелдену и парафиновым желтым S [10]. Контролем служили интактные и прооперированные крысы, ПЖ которых не подвергалась обработке хлороформом. Клетки фотометрировали с помощью анализатора изображений микрообъектов (по 100 на каждый случай). Одновременно определяли общую численность и доли жизнеспособных одно- и двуядерных гепатоцитов разной плотности (более подробно см. [1, 3, 9]).

Результаты и обсуждение. Данные, характеризующие содержание суммарного белка в одно- и двуядерных гепатоцитах разной плотности при ЭОП и в норме, представлены ниже (табл.1). Прежде всего отметим, что увеличение количества белка в гепатоцитах здоровых крыс по мере возрастания плотности не соответствует пропорции 2:4:8..., поэтому отношение белок/ДНК для 4с- и 8с-клеток, как и для их двуядерных аналогов, имеет более низкие значения, чем для 2с-клеток. Это соотношение сохраняется и при ЭОП, хотя содержание белка в клетках больных животных, несмотря на значительные колебания, в подавляющем большинстве выше, чем в контроле. В отличие от экзокринных панкреатитов (ЭП), в которых содержание белка после индукции ЭОП сначала резко понижается и лишь по выходе из фазы "первичного аффекта" начинает нарастать [2], в гепатоцитах оно повышается с первых же часов развития болезни. Заметим, что в гепатоцитах и интактных, и больных животных вообще содержится гораздо больше белка, чем в ЭП. В клеточке содержания белка и в ЭП [2], и в гепатоцитах проявляется цикличность в связи с прохождением различных этапов ЭОП, но у последних она более выражена. Характер повышения и снижения

количества белка в одно- и двуядерных гепатоцитах разной ploидности аналогичен (табл. 1). Поскольку количество белка мы определяли лишь в клетках, строго соответствующих по содержанию ДНК классам ploидности и сохранившим нормальную структуру, постольку это свидетельствует об идентичности реакций всех жизнеспособных клеток популяции на воздействие панкреатогенных факторов, по крайней мере, если судить о них по данному параметру. Правда, выраженность реакций в клетках разной ploидности различна. Так, наибольшие перепады в содержании белка и различия между его "пиковыми" и контрольными значениями выявляются во фракции (2c+2c) клеток и отражают вышеуказанную, по нашему мнению, степень их реактивности. Реактивность 2c и в особенности 4c клеток выражена слабее. При сравнении 8c и (4c+4c) клеток наблюдается обратная картина. Здесь большую степень реактивности проявляют одноядерные 8c клетки, содержание суммарного белка в которых достигает самых высоких значений в популяции при прохождении ею критических фаз в процессе панкреатита (табл. 1). Следует отметить, что уровень содержания белка в клетках также является одним из факторов регуляции их жизнеспособности, например, активности пролиферации, которая находится в обратной зависимости от количества белка, накопленного в клетке [9]. Сравнение кинетики активности пролиферации гепатоцитов на разных этапах ЭОП [1] и содержания белка (табл. 1) показывает, что она (с некоторыми отклонениями на раннем этапе ЭОП, обусловленными действием надклеточных патогенных факторов) четко проявляется и в данном случае, особенно в период перехода панкреатита в хронику между 14 и 30 сутками, когда в моменты наибольшего накопления белка митотическая и ДНК-синтезирующая активность клеток резко падает (на 14 и 22 сут), а затем (на 30 сут) снижается до минимального уровня.

Таблица 1. Изменение содержания суммарного белка в гепатоцитах крыс при ЭОП

Срок после индукции ЭОП	Содержание суммарного белка в клетках разной ploидности, г/г бел., $\bar{x} \pm S$				
	2c	4c	2c+2c	8c	4c+4c
0 (контроль)	171,7±1,4	314,2±2,2	261,6±4,0	630,4±3,3	668,1±3,9
6 ч	242,1±1,4	384,0±2,4	0	0	627,3±2,9
1 сут	282,9±3,7	447,9±4,3	557,1±4,9	0	0
3 сут	150,4±2,2	293,4±1,4	363,2±6,4	0	0
7 сут	218,7±3,1	415,2±3,6	516,8±7,1	739,7±5,3	714,9±7,7
14 сут	332,0±3,1	414,6±5,4	376,5±8,1	0	615,3±3,7
20 сут	186,7±2,1	342,8±2,9	269,4±6,4	0	580,6±4,4
21 сут	245,8±1,8	359,7±8,8	340,6±1,6	633,2±4,4	541,9±5,2
22 сут	183,2±3,7	292,5±2,7	272,1±2,0	537,8±2,6	522,6±5,4
30 сут	326,7±2,0	585,7±4,2	600,2±7,7	0	0

Столь высокая лабильность содержания белка в гепатоцитах при ЭОП, как и сама возможность ее, очевидно, объясняется запрограммированной "готовностью" систем контроля за ситуацией и метаболизмом этих клеток к немедленной активации синтеза белков, в нашем случае ответственных, по-видимому, за выполнение дезинтоксикационной функции. Это предположение подтверждается нашими данными (табл. 2). Видно, что вслед за понижением общей численности клеток и (что важнее) доли среди них жизнеспособных, в последних возрастает содержание белка. Напротив, увеличение доли жизнеспособных клеток сопровождается снижением содержания в них белка. Отсюда можно заключить, что в регуляции жизнедеятельности гепатоцитов принимают участие и внутриклеточные, и популяционные механизмы контроля за ситуацией.

Результаты исследований, представленные в [1, 8], свидетельствуют о том, что популяция гепатоцитов является в высшей степени динамичной и реактивной системой. Это находит отражение не только в непрерывных изменениях содержания белка, но и в кинетике ДНК-

синтезирующей и митотической активности, накопления и расходования энергетических ресурсов и, наконец, в постоянном перераспределении клеточного состава популяции по плодности. Высокая динамичность и реактивность этой саморегулирующейся популяции клеток обусловлена, как указывалось [8], уникальной полифункциональностью печени и той ролью, которую она играет в организме.

Таблица 2. Изменение числа жизнеспособных гепатоцитов и среднего содержания в них суммарного белка у крыс при ЭОП

Сроки после индукции ЭОП	Общее число клеток в 0,01 мм площади среза, % от их числа в контроле*	Число жизнеспособных клеток в 0,01 мм, % от общего числа клеток на соответств.срок при ЭОП	Содержание белка в жизнеспособных клетках, % от его содержания в контроле
6 ч	92,6	89,0	111,5
1 сут	85,0	94,0	108,5
3 сут	92,9	91,3	91,3
7 сут	74,1	93,9	108,4
14 сут	97,4	96,0	119,5
20 сут	100,0	94,1	87,2
21 сут	100,0	92,2	127,5
22 сут	100,0	94,0	103,0
30 сут	95,5	86,5	125,8

Примечание: * Подсчет клеток производится при об. 100 х и ок. 12,5 х.

Чем же можно объяснить то, что подобная система оказывается не в состоянии предотвратить переход панкреатита в хронику, хотя казалось бы она располагает для этого всеми возможностями? Почему высокая активность гепатоцитов, проявляющаяся на первых этапах ЭОП, в дальнейшем идет на спад и кратковременный всплеск их активности на 21 сут не меняет общей картины структурно-функциональной стабилизации популяции?

Исходя из результатов анализа данных, представленных в наших сообщениях, можно сделать вывод о том, что в этом "повишши" не столько внутриклеточные, сколько популяционные механизмы регуляции функционирования системы в целом. Будучи в значительной степени самоорганизующейся и в то же время открытой системой, популяция гепатоцитов быстро реагирует на экстремальность ситуации активацией всех средств для защиты "собственных интересов", что лишь опосредованно воздействует на процессы, идущие в ПЖ при ЭОП. Затем, пройдя период адаптации к экстремальным условиям, система выходит на новый уровень гомеостаза, при котором ее реакция на повторные стимулы о ситуации в ПЖ ослабевают. В этом, как мы полагаем, заключается одна из главных причин перехода заболевания в хроническое состояние. Чтобы вывести популяцию из создавшегося динамического "равновесия", требуется воздействие новых факторов, стимулирующих функциональную активность клеток печени и способных дестабилизировать равновесное состояние популяции. К таким факторам относятся биологически активные вещества, одно из которых - тиосульфат натрия (ТСН) - было использовано в нашей работе. Часть материалов, касающаяся воздействия ТСН на поведение ЭП при ЭОП и свидетельствующая о его положительном эффекте, была опубликована ранее [4]. Вторая часть, отражающая изменения в реакциях гепатоцитов на ЭОП в присутствии ТСН, представлена в следующем сообщении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аюкян Л.А., Габриэлян Н.А., Канакян А.С., Каралова Е.М., Магакян Ю.А. Цитология, 36, 8, 829, 1994.

2. Каралова Е.М., Араратян Л.А., Габриэлян Н.А., Канаян А.С., Магакян Ю.А. Цитология, 32, 9, 893, 1990.
3. Каралова Е.М., Габриэлян Н.А., Канаян А.С., Магакян Ю.А. Цитология, 32, 4, 337, 1990.
4. Каралова Е.М., Канаян А.С., Араратян Л.А., Габриэлян Н.А., Магакян Ю.А. Цитология, 32, 12, 1205, 1990.
5. Магакян Ю.А. Итоги науки и техники. Сер.: Общие проблемы физико-химической биологии. 15, М., 1990.
6. Магакян Ю.А., Каралова Е.М. Итоги науки и техники. Сер.: Общие проблемы физико-химической биологии. 16, М., 1991.
7. Магакян Ю.А., Каралова Е.М. Цитофотометрия ДНК. Ереван, 1989.
8. Магакян Ю.А., Каралова Е.М., Акопян Л.А., Габриэлян Н.А., Киняян А.С. Биолог. журн. Армении. 49, 3-4, 145-148, 1996.
9. Магакян Ю.А., Найджарян Н.У., Колтухчева Н.А. Цитология, 29, 4, 465, 1987.
10. Gaub J., Zetterberg A. Exp. Cell Res, 92, 325, 1975.

Поступила 22.IV.1996

Биолог. журн. Армении, 3-4 (49), 1996

УДК 579.64:631.46

**AGROBACTERIUM եւ FLAVOBACTERIUM ՅԵՂԵՐԻ ԱՍՈՑԻԱՏԻՎ
ՂԻԱԶՈՏՐՈՖՆԵՐՈՂ ՅՈՐԵՆԻ ՌԻԶՈՊԼԱՆՈՒՄ**

Վ. Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ միկրոօրգանիզմի ինստիտուտ, 378510, ք. Արուվյան

Ղիազոտրոֆներ - տիզուպլան - ցորեն - ազոտֆիքսացիա

Բերեստեցլին և ուրիշները ցույց են տվել, որ *Agrobacterium*-ը հանդիսանում է բույսերի արմատային համակարգում դոմինանտ ոչ սինթետիկ ազոտֆիքսատորներից մեկը [2]: *Ag. radiobacter* տեսակին պատկանող նոր ղիազոտրոֆ մեկուսացվել է նաև ցորենի գիստոսֆերայից [5]: *Azotobacter*-ին ուղեկցող N₂-ի ֆիքսման ակտիվությամբ օժտված *Flavobacterium* դեռ վաղ ժամանակներից մեկուսացվել է Եգիպտոսի հողերից [6]: Փորձարկվել են նաև *Agrobacterium*-ից և *Flavobacterium*-ից ստացված պրեպարատների ներգործությունը հացազգի և բանջարանոցային տարբեր կուլտուրաների աճման վրա [1,3]:

Հայաստանի հողերում և բույսերի արմատային զոնայում վերոհիշյալ ղիազոտրոֆների առկայության մասին տեղեկություններ չկան: Այն մեզ հաջողվել է մեկուսացնել ազոտֆիքսող մանրէների մի բարդ համակեցությունից, որի ուսումնասիրության արդյունքները ներկայացվում են սույն հաղորդմամբ:

Ելուր և մեթոդ Աշխատանքում օգտագործվել է ցորենի ռիզոպլանից (Աշտարակի շրջան, գյուղ Ագարակ) մեկուսացված A 51 ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունը (ԱԱՀ): Փորձերի ընթացքում համեմատության համար օգտագործվել է նաև Հայաստանի Սանրենի Ավանդադրման Հանրապետական կենտրոնում (ՌՅՂԱ) պահպանվող *A. chroococcum* IMIMIA B-6111 շտամը:

ԱԱՀ-ում զարգացող ղիազոտրոֆների և նրանց ուղեկցող մանրէների հայտնաբերման համար օգտագործվել են էլքիի, Չապեկի, Վինոգրադսկու և ՄՊԱ սննդամիջավայրերը, իսկ *Azospirillum*-ի համար **RC** [8] սննդամիջավայրը:

Սանրենի փոխհարաբերության բնույթն ուսումնասիրվել է Վինոգրադսկու հեղուկ սննդամիջավայրում, կուլտուրաների համատեղ զարգացման պայմաններում: Այդ նպատակով 15մլ տարողության 3մլ սննդամիջավայր պարունակող պենիցիլինի սրվակները վարակվել են ԱԱՀ-ում զարգացող տարբեր թվաքանակներով և զարգացման ընթացքում պարբերաբար որոշվել է ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը:

Կուլտուրաների իրենտիֆիկացիան կատարվել է Բերգեի [7] որոշիչով, իսկ ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը Վինոգրադսկու հեղուկ սննդամիջավայրում որոշվել է աջետիլենային եղանակով, որի մեթոդական մասը մեր կողմից ներկայացվել է նախկինում [4]:

Արդյունքներ և քննարկում: Տարբեր սննդամիջավայրերի վրա կատարած ուսումնասիրություններից պարզվեց, որ A 51 ԱԱՀ-ը բաղկացած է *Azospirillum*-ից, երկու