

Г. В. БАРСЕГЯН

ИЗМЕНЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ,
МЫШЦ И ПЕЧЕНИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭТАНОЛАМИНА

В настоящее время установлено, что этаноламин усиливает синтез белка в различных тканях животного организма [1—4], а также повышает активность некоторых ферментов [4—6]. Для выяснения характера действия этаноламина на обмен белков необходимо изучение их фракционного состава. С этой целью нами был применен метод электрофоретического разделения на бумаге белков сыворотки, а также водорастворимых белков мышц и печени.

Опыты были поставлены на белых крысах весом 150—200 г. Одна группа крыс служила контролем, а другая с кормом получала этаноламин в течение одного месяца из расчета 10 мг/кг. По истечении этого срока крыс обезглавливали парами, быстро собирали кровь для получения сыворотки, после чего интересующие нас органы и ткани брали на исследование. Всю процедуру, а также электрофорез белков тканей проводили в низкотемпературной камере при плюс 2—4°C.

Электрофорез белков сыворотки крови проводили в условиях комнатной температуры в веронал-мединаловом буфере (рН—8,6, ионная сила—0,37) при градиенте потенциала 8 в/см и силе тока 0,4 мА/см полоски в течение 19 ч. После высушивания и подогревания при 105°C полоски бумаги окрашивали бромфеноловым синим обычным способом.

Для экстрагирования водорастворимых белков печень перфузировали физиологическим раствором с целью удаления следов крови, после чего навеску ткани измельчали ножницами, добавляли физиологический раствор, равный половине навески ткани, и гомогенизировали в течение нескольких минут в гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема. Гомогенат переносили в центрифужную пробирку, добавляли эфир при постоянном помешивании до образования слоя эфира. После центрифугирования при 3000 хг в течение 15 мин. из образовавшихся трех слоев при помощи заостренной пипетки собирали нижний слой, переносили в центрифужную пробирку, которую помещали в водяную баню на 15 мин. при 37° для осаждения различных примесей. После центрифугирования при 3000 хг в течение 10 мин. снова образовалось три слоя: нижний слой являлся осадком, верхний представлял собой пробковидное образование, а средний являлся прозрачной розоватой жидкостью. Средний слой тщательно собирали, из него брали 45 мкл для нанесения на бумагу. Электрофорез водорастворимых белков печени проводили на борно-боратном буфере (рН—8,69) при градиенте потенциалов 8 в/см и 0,4 мА/см в течение 21 ч. Окраску электрофореграмм производили анилиновым красителем.

Для экстрагирования водорастворимых белков бедренных и сердечной мышц после перфузии физиологическим раствором через брюшную аорту мышцы тщательно очищали от жира, сухожилий, фасций, после чего определенные навески скелетных мышц (сердце целиком брали в гомогенизатор) измельчали ножницами, добавляли на каждый грамм мышц 3 мл фосфатного буфера (рН—7,6) и гомогенизировали в течение 3 мин. Экстракция водорастворимых белков продолжалась на холоде при медленном и постоянном помешивании стеклянной палочкой, приспособленной на моторе, в течение 60 мин. (скелетные мышцы) и 90 мин. (сердечные мышцы). По истечении этого срока гомогенаты центрифугировали 30 мин. при 5000 xg (скелетные мышцы) и 17 000 xg (сердечные мышцы). Надосадочную жидкость декантировали и наносили на бумагу в количестве 30 мкл. Электрофорез водорастворимых белков мышц проводили на фосфатном буфере (Na_2HPO_4 0,048 М и NaH_2PO_4 0,006 М) с рН, равной 7,6, и ионной силой, равной 0,1, при градиенте потенциала 7 в/см и силе тока 0,5 мА/см в течение 21 ч. при +4°C. После высушивания и подогревания бумажные полоски окрашивали амидошварцем.

Для электрофоретического разделения белков использовали электрофоретический аппарат типа ЭФА-1 и хроматографическую бумагу марки «Б». Графическое изображение полученных электрофореграмм производилось при помощи денситометра типа MGF. Соотношение фракций устанавливалось путем измерения площадей кривых планиметром.

Электрофоретическое разделение водорастворимых белков мышц выявляет наличие 6 фракций: n, m, L, K_1 , K_2 и h, из которых первые три, а также K_1 и K_2 иногда сливаются [16, 17]. Фракция n+m+L содержит миоген Барановского, ферменты D-глюкозо-1,6-дифосфат: D-глюкозо-1-фосфотрансфераза (фосфоглюкомутаза), кетозо-1-фосфатальдегид-лиаза (альдолаза) и др. Фракция $K_1 + K_2$ содержит ферменты α -1,4-глюкан: ортофосфат-глюкозил-трансферазы (фосфорилазы). Фракция h содержит миоальбумин.

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что у контрольных животных соотношения белковых фракций несколько отличаются в скелетных и сердечных мышцах. Так, в сердечной мускулатуре миоальбуминовая фракция, а также фракция фосфорилаз представлены в большем количестве, чем в скелетной мускулатуре; наоборот, миогеновая фракция содержится в меньшем количестве. Аналогичная картина описывается также другими исследователями [7]. Из этих же данных видно, что у крыс, получавших этаноламин, наблюдается статистически достоверное повышение процентного содержания фракций K_1 и K_2 и понижение фракции h. Изменение во фракции n+m+L недостоверное. Увеличением содержания фракции $K_1 + K_2$, содержащей ферменты, участвующие в процессе гликогенолиза, объясняется усиление процесса гликогенолиза, отмеченное в прежних исследованиях нашей лаборатории [8].

По данным литературы [9, 10], фракция h является запасной фракцией, характерной для эмбриональной ткани, из которой синтезируются

Таблица 1

Фракция водорастворимых белков скелетных и сердечных мышц крыс, получавших этаноламин (средние данные 19 опытов)

Условия опыта	Скелетные мышцы			Сердечные мышцы			
	фракции			фракции			
	$n+m+L$	K_1+K_2	h	$n+m+L$	K_1+K_2	h	
Контроль	М $\pm\sigma$	71,2 $\pm 3,87$	22,2 $\pm 4,63$	6,6 $\pm 2,01$	61,8 $\pm 5,31$	27,4 $\pm 5,20$	10,8 $\pm 2,76$
Этаноламин	М $\pm\sigma$	69,4 $\pm 4,70$	27,8 $\pm 4,72$	2,8 $\pm 1,30$	60,2 $\pm 5,08$	34,7 $\pm 4,75$	5,1 $\pm 2,20$
Достоверность		$t=1,24$ $0,2 < p < 0,3$	$t=3,71$ $p < 0,01$	$t=7,03$ $p < 0,01$	$t=0,98$ $0,3 < p < 0,4$	$t=4,65$ $p < 0,01$	$t=7,31$ $p < 0,01$

структурные белки мышечной ткани. Уменьшение содержания фракции h у крыс, получавших этаноламин, находится в полном согласии с увеличением содержания миозина и актомиозина, отмеченным нами под действием этаноламина в других опытах.

Кроме указанных количественных изменений, у крыс, получавших этаноламин, наблюдается лучшее разделение отдельных фракций.

Таблица 2

Белковые фракции сыворотки крови белых крыс, получавших этаноламин (средние данные 20 опытов)

Условия опыта	Альбумины	α_1 -глобулины	α_2 -глобулины	β -глобулины	γ -глобулины	
Контроль	М $\pm\sigma$	49,0 $\pm 3,6$	8,6 $\pm 1,6$	9,0 $\pm 1,4$	19,2 $\pm 3,6$	14,2 $\pm 3,4$
Этаноламин	М $\pm\sigma$	53,5 $\pm 3,0$	7,7 $\pm 1,8$	7,9 $\pm 2,1$	17,5 $\pm 3,9$	13,4 $\pm 2,9$
Достоверность		$t=4,32$ $p < 0,01$	$t=1,63$ $0,1 < p < 0,2$	$t=1,88$ $0,05 < p < 0,1$	$t=1,41$ $0,1 < p < 0,2$	$t=0,79$ $0,4 < p < 0,5$

Изучение белковых фракций сыворотки крови выявило достоверное повышение альбуминовой фракции (на 9,1%) и недостоверное понижение всех глобулиновых фракций у животных, получавших этаноламин.

По данным ряда авторов [11, 12], изменение электрофоретической подвижности сывороточных белков может быть следствием их комплексообразования с углеводами, липидами, анионами, катионами, гормонами и др. Другой причиной изменения фракционного состава сывороточных белков является изменение скорости их синтеза. С этой точки зрения источники сдвигов альбуминовой фракции следует искать в печени, которая является главным и, может быть, единственным «поставщиком» сывороточных альбуминов. Для выяснения роли печени в увеличении содержания альбуминов мы изучали фракционный состав водорастворимых белков этого органа.

Нами выделялись 6 основных фракций водорастворимых белков пе-

чени: А, Б, В, Д, Е, Ж. Наличие этих фракций описывается также другими исследователями [13, 14]. Если сопоставить электрофореграммы белков печени с таковыми сыворотки крови, то можно заметить, что фракция А по своей электрофоретической подвижности соответствует альбуминам сыворотки крови. Фракции Б и В расположены напротив α -глобулинов, фракция Д соответствует β -глобулинам, Е— γ -глобулинам, а фракция Ж зачастую расположена за пределами γ -глобулинов.

Таблица 3

Фракции водорастворимых белков печени у крыс, получавших этаноламин (средние данные 21 опыта)

		А	Б	В	Д	Е	Ж
Контроль	М	9,8	18,2	28,3	19,3	12,9	11,5
	$\pm\sigma$	$\pm 3,16$	$\pm 3,86$	$\pm 2,73$	$\pm 3,05$	$\pm 2,98$	$\pm 2,40$
Этаноламин	М	12,3	16,7	27,3	18,5	13,3	11,9
	$\pm\sigma$	$\pm 2,84$	$\pm 3,60$	$\pm 2,58$	$\pm 3,22$	$\pm 2,90$	$\pm 3,22$
Достоверность	t	t=2,65	t=1,31	t=1,13	t=0,84	t=0,44	t=0,46
	p	p<0,01	0,1<p<0,2	0,2<p<0,3	p=0,4	0,6<p<0,7	0,6<p<0,7

Приведенные в табл. 3 данные показывают, что у крыс, получавших этаноламин, наблюдается достоверное повышение фракции А. Изменения в остальных фракциях недостоверны. Так как белки, входящие во фракцию А, почти полностью идентичны альбуминам сыворотки крови не только своей подвижностью, но также иммунологическими свойствами [15], то можно допустить, что у крыс, получавших этаноламин, увеличение альбуминовой фракции сыворотки крови вытекает из увеличения альбуминовой фракции в печени.

Таким образом, наблюдаемое нами усиление анаболических процессов водорастворимых белков печени направлено в основном в сторону синтеза альбуминов, играющих важную роль в различных функционально-биохимических процессах животного организма.

В ы в о д ы

1. В скелетной и сердечной мускулатуре крыс, получавших этаноламин, процентное содержание фракций K_1 и K_2 повышается, а фракции h —понижается.

2. Увеличением фракций K_1 и K_2 , содержащих ферменты, участвующие в процессе гликогенолиза, можно частично объяснить наблюдаемое под действием этаноламина усиление гликогенолиза, а уменьшение фракции h , являющейся запасным белком, совпадает с усилением синтеза структурных белков мышц у крыс, получавших этаноламин.

3. Под влиянием этаноламина увеличивается содержание альбуминовой фракции в сыворотке крови и в печени белых крыс.

4. Полученные данные приводят к предположению, что наблюдаемое под влиянием этаноламина повышение активности некоторых ферментов можно объяснить увеличением их количественного синтеза.

Գ. Վ. ԲԱՐՍԵԳՅԱՆ

ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ, ՄԿԱՆՆԵՐԻ ԵՎ ԼՅԱՐԴԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՅԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷԹԱՆՈԼԱՄԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ներկայումս կուտակված փաստերը վկայում են այն մասին, որ էթանոլամիինն ուժեղացնում է սպիտակուցների սինթեզը զանազան հյուսվածքներում և բարձրացնում է որոշ ֆերմենտների ակտիվությունը: Բնութագրելու համար էթանոլամիինի ազդեցությունը սպիտակուցային փոխանակության վրա մեր առաջ խնդիր դրեցինք ուսումնասիրել սպիտակուցների ֆրակցիոն կազմը: Արյան շիճուկի, ինչպես նաև մկանների և լյարդի ջրալույծ սպիտակուցների բաժանումը կատարեցինք թղթի վրա էլեկտրոֆորեզի եղանակով:

Հետազոտությունները կատարվել են սպիտակ առնետների վրա, որոնց մի մասը մեկ ամսվա ընթացքում կերի հետ միասին ստացել է էթանոլամիին 10 մգ/կգ քանակությամբ:

Մեր փորձերի արդյունքների հիման վրա կարելի է հանգել հետևյալ եզրակացություններին՝

1. էթանոլամիին ստացող առնետների կմախքային և սրտային մկաններում K_1 և K_2 ֆրակցիաների տոկոսային հարաբերությունը բարձրանում, իսկ H ֆրակցիայի տոկոսային հարաբերությունն իջնում է:

2. K_1 և K_2 ֆրակցիաների շատացումով (որոնք պարունակում են գլիկոգենոլիզի պրոցեսին մասնակցող ֆերմենտներ) կարելի է մասամբ բացատրել էթանոլամիինի ազդեցության տակ նկատվող գլիկոգենոլիզի արագացումը, իսկ H ֆրակցիայի պակասեցումը (որը հանդիսանում է պահեստային սպիտակուց) համընկնում է մկանների ստրուկտուրային սպիտակուցների սինթեզման ուժեղացման հետ էթանոլամիին ստացող առնետների մոտ:

3. էթանոլամիինի ազդեցության տակ առնետների արյան շիճուկում և լյարդում շատանում է ալբումինային ֆրակցիան:

4. Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս ենթադրել, որ էթանոլամիինի ազդեցության տակ նկատվող որոշ ֆերմենտների ակտիվության բարձրացումը հնարավոր է բացատրել նրանց քանակական սինթեզով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Барсегян Г. В. Материалы межвузовской конференции по проблеме влияния биостимуляторов на организм животных и их применения в с/х практике. Ереван, 1963, стр. 9.
2. Барсегян Г. В. Материалы II Всесоюзной конференции по физиологическим и биохимическим основам повышения продуктивности с/х животных. Боровск, 1963, стр. 90.
3. Барсегян Г. В. Тезисы докладов I Всесоюзного биохимического съезда, 1964, вып. 3, стр. 201.
4. Барсегян Г. В. Труды Ереванского зооветеринарного института, 1964, 26, стр. 29.
5. Камалян Г. В. и Мнацаканян А. А. Труды Ереванского зооветеринарного института, 1956, 20, стр. 5.
6. Камалян Г. В. и Барсегян Г. В. Биохимия, 1959, 24, стр. 1070.
7. Оганесян С. С. и Заминян Т. С. Доклады АН Арм. ССР, 1962, 34, стр. 207.
8. Камалян Г. В., Гаспарян М. Г. и Барсегян Г. В. Доклады АН Арм. ССР, 1958, 27, стр. 295.

9. Владимиров Г. Е. и Ярославцев А. П. Труды Военно-медицинской РККА, 1940, стр. 63.
10. Касавина Б. С. и Торчинский Ю. М. Биохимия, 1956, 21, стр. 510.
11. Троицкий Г. В., Окулов В. И. и Соркина Д. А. Биохимия, 1961, 26, стр. 44.
12. Капланский С. Я. Терапевтический архив, 1962, 2, стр. 3.
13. Капланский С. Я., Кузовцева О. Б. и Успенская В. Д. Биохимия, 1956, 21, стр. 469.
14. Капланский С. Я. и Кузовцева О. Б. Биохимия, 1957, 1—2, стр. 162.
15. Капланский С. Я., Гурвич А. Е. и Старосельцева Л. К. Биохимия, 1958, 23, стр. 114.
16. Tonini G., Missere G. Boll. del Soc. Ital. Biol. sperim., 1957, 33, стр. 493.
17. Dubuisson M. Biol. Rev., 1950, 25, стр. 46.