

Т. Л. АРУТЮНЯН, Р. Л. ОРЛЯНСКАЯ

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ S^{35} В БЕЛКАХ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ПОСТУПЛЕНИЯ РАДИОАКТИВНОГО СУЛЬФАТА

Вопросу о возможности включения серы сульфата в белки при однократном введении изотопа посвящено немало работ. Так, некоторые исследователи [6, 7, 9, 10] получили убедительные данные в пользу возможной утилизации серы в организме млекопитающих для синтеза серосодержащих аминокислот, в частности цистеина. В случае использования сульфата S^{35} в белковом обмене при длительном поступлении изотопа в организм можно ожидать действия его на тканевые белки.

В литературе нам не удалось найти работ, посвященных вопросу хронического воздействия радиоактивного сульфата на белки тканей.

Выполненные в последние годы исследования по воздействию сульфата S^{35} посвящены в основном влиянию его на растущий хрящ у крыс [2], периферическую кровь и особенностям распределения изотопа в целом организме [4].

Было показано равномерное распределение S^{35} по тканям крыс в условиях хронического эксперимента.

Целью данной работы явилось изучение распределения S^{35} в белках структурных элементов клеток печени крыс после 2, 4 и 6 мес. поступления изотопа в организм.

В опытах были использованы крысы-самцы весом 50—60 г. Подопытные животные были разделены на три группы. К каждой группе имелся физиологический контроль. Крысы первой подопытной группы в течение 2 мес., а второй и третьей в течение 4 и 6 мес. ежедневно получали с питьевой водой раствор радиоактивного сульфата натрия, меченного по S^{35} . Вводимая доза сульфата составляла 1 мкк/г веса животного.

Кроме того, чтобы проследить за скоростью процессов обмена у животных при длительном поступлении радиоактивного сульфата мы применили прижизненную метку радиоактивным фосфором. Животным подопытных и контрольных групп за 2,5 ч. до забоя подкожно вводили P^{32} в дозе 20 мкк/100 г веса. За сутки до забоя животных лишали корма. Крыс убивали декапитацией, печень перфузировали через воротную вену охлажденным раствором 0,85% NaCl. Гомогенизацию печени проводили в стеклянном гомогенизаторе на холоду. Суммарный белок из гомогената выделяли осаждением 10%-ной трихлоруксусной кислотой.

Для выделения фракций структурных элементов клеток гомогенат подвергали дифференциальному центрифугированию в 0,25 М сахарозе

по методу Шнайдера [11]. Таким путем были осаждены фракции ядер и митохондрий. Надосадочная жидкость или супернатант, полученная после осаждения митохондрий, включала микросомальную фракцию и гиалоплазму.

Суммарный белок каждой фракции получали осаждением 10%-ной трихлоруксусной кислотой.

Осадки, отделенные центрифугированием, отмывали 5%-ным раствором этой же кислоты, и промывные жидкости проверяли на активность (по S^{35} и P^{32}).

Экстракцию липидов проводили спирт-эфирной смесью при кипячении. Воздушно-сухие белки ядер, митохондрий и фракции «супернатант» получали после обработки осадков эфиром. Количество полученных белков определяли взвешиванием. Для подсчета радиоактивности белков пользовались торцовым счетчиком БФЛ-25. Просчитывалась общая активность белков (S^{35} и P^{32}) в толстом слое.

Мягкое β -излучение отфильтровывали алюминиевой фольгой, после чего подсчитывали активность P^{32} . Активность S^{35} вычисляли, вычитывая из общей активности P^{32} . Активность S^{35} и P^{32} выражали числом импульсов в минуту, приходящихся на суммарный белок из 1 г сухого остатка печени. Результаты опытов подвергали статистической обработке с помощью фактора Молденгауера [3].

Чтобы проследить за распределением активности S^{35} в суммарных белках фракций ядер, митохондрий и супернатанта, мы прежде всего определили выход белка в каждой из полученных фракций (табл. 1).

Таблица 1

Количество суммарного белка во фракциях клеточных органелл печени крыс при длительном поступлении $Na_2S^{35}O_4$ (в мг/г сухого остатка ткани)

Фракции	Срок затравки (в месяцах)					
	2		4		6	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
Гомогенат	614 ±30,6	648 ±16,7	697 ±11,1	628 ±7,9	509 ±37,9	528 ±40,3
Я д р а	326 ±24,8	354 ±19,4	410 ±14,5	427 ±7,4	359 ±27,2	377 ±51,5
Митохондрии	31 ±1,57	26 ±1,7	32 ±1,0	16 ±0,6	23 ±0,4	18 ±2,8
Супернатант	197 ±7,9	216 ±5,3	288 ±13,1	249 ±16,6	115 ±16,5	190 ±15,2

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что через 2 мес. хронического* воздействия радиоактивного сульфата количество суммарного белка из гомогената печени по сравнению с контролем не изменяется. Вместе с тем наблюдаются изменения в выходе суммарного белка во фракциях клеточных органелл. Так, количество суммарного белка во фракции митохондрий увеличено ($t=2,5$), тогда как во фракции супер-

натанта понижено ($t=3,2$). У животных, получавших сульфат S³⁵ в течение 4 мес. выход белка из гомогената печени повышен ($t=5$) за счет увеличения количества белка митохондриальной фракции ($t=13,7$). Через 6 мес. воздействия S³⁵ количество суммарного белка из гомогената, ядерной и митохондриальной фракции не менялось по сравнению с соответствующими фракциями контроля. Следует подчеркнуть, что выход белка из фракции супернатант в этот же срок был ниже ($t=3,4$), чем у животных, не получивших сульфата S³⁵.

Распределение активности S³⁵ в суммарных белках гомогената и фракциях клеточных органелл печени в разные сроки хронического воздействия представлены в табл. 2.

Таблица 2

Распределение активности S³⁵ в различных фракциях клеток печени крыс при длительном поступлении Na₂S³⁵O₄ (имп/мин. в суммарном белке на 1 г сухого остатка ткани)

Фракции	Сроки затравки (в месяцах)		
	2	4	6
Гомогенат	22366±1300,4	16210± 99,6	11052±1066,7
Я д р а	12270±1042,9	8745±233,3	8149± 583,5
Митохондрии	1015± 49,2	629± 11,9	315± 8,3
Супернатант	5109± 318,9	6605±350,7	2137± 295

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что в условиях хронического эксперимента происходит перераспределение активности S³⁵ во фракциях органелл печени. Так, через 2 мес. ежедневного поступления в организм крыс раствора Na₂S³⁵O₄ активность S³⁵ в ядрах

Таблица 3

Распределение активности P³² в различных фракциях клеток печени крыс при длительном поступлении Na₂S³⁵O₄ (имп/мин. в суммарном белке из 1 г сухого остатка)

Фракции	Сроки затравки (в месяцах)					
	2		4		6	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
Гомогенат	20023 ±989,9	27102 ±911,3	14067 ±262,8	12280 ±139,2	13296 ±1339,6	12174 ±1436,0
Я д р а	11331 ±812,7	16148 ±1464	8330 ±109,4	9673 ±98,4	7487 ±146,7	9590 ±629,0
Митохондрии	519 ±34,5	775 ±46,3	153 ±2,17	261 ±8,3	617 ±42,5	178 ±44,4
Супернатант	7784 ±516	9598 ±664,9	4032 ±117,9	6324 ±198,6	2325 ±148,5	6223 ±207,2

составляет 54% активности гомогената, в митохондриях и супернатанте соответственно 4,5 и 22%.

После 4 мес. поступления изотопа отмечено достоверное снижение активности S³⁵ в белках гомогената и фракциях органелл. Активность

ядер и митохондрий составляет соответственно 53 и 3,8%, а фракции супернатант—40% активности гомогената.

Через 6 мес. воздействия изотопа активность S^{35} (в сравнении с 4-ым мес.) в гомогенате и исследуемых фракциях оказалась сниженной. К этому сроку происходит перераспределение активности: в ядрах—73%, митохондриях—2,8%, супернатанте—19% от активности гомогената. Существенно возрастает активность фракции ядер (по отношению к общей активности гомогената) и несколько снижается активность митохондрий и супернатанта.

Данные по включению в суммарные белки радиоактивного фосфора P^{32} представлены в табл. 3. Из таблицы следует, что через 2 мес. хронического воздействия S^{35} активность P^{32} в белках гомогената, ядер, митохондрии и супернатанта по сравнению с контролем снижена.

К 4-у мес. исследования включение P^{32} в белки всех клеточных фракций также ниже контрольных величин. После 6 мес. воздействия S^{35} сульфата мы получили достоверное снижение активности P^{32} в белках ядер и супернатанта. Во фракции митохондрий активность P^{32} в этот же срок была значительно выше соответствующих значений в группе контроля.

Общезвестно, что торможение включения P^{32} в суммарный белок свидетельствует об уменьшении напряженности процессов белкового обмена.

Проследив за распределением активности S^{35} и P^{32} в разные сроки хронического воздействия $Na_2S^{35}O_4$, мы определили наибольшую активность в суммарных белках клеточных фракций через 2 мес. исследования.

От второго к шестому месяцу у животных подопытных групп отмечалось постепенное снижение активности как S^{35} , так и P^{32} , что, по-видимому, является результатом хронического поступления в организм радиоактивного сульфата. Наибольшие изменения количества суммарного белка у животных подопытных групп были найдены во фракции супернатант, в состав которой входит микросомальная фракция и гиалоплазма. Через 2 мес. воздействия изотопа количество суммарного белка этой фракции по сравнению с контролем уменьшилось, а после 6 мес. составляло всего 60%. Значительному снижению суммарного белка соответствовало и уменьшение включения P^{32} (на 63%).

С. Я. Капланский и О. Б. Кузовлева [1], изучая распределение отдельных белковых фракций между структурными элементами клеток печени методом электрофореза на бумаге, нашли в гиалоплазме фракцию белков с подвижностью сывороточного альбумина. По данным Р. Б. Хесина [5], сывороточный альбумин, являясь одним из основных белков, образуемых печенью, синтезируется в клетках больших гранул и переходит из них в другие части клетки, в частности в микросомы. Некоторые исследователи, изучая включение S^{35} в белки сыворотки крови крыс при однократном введении радиосульфата, не получили уменьшения активности S^{35} после 42-часового диализа, что с несомненностью указывает на прочный характер связи S^{35} с белком сыворотки.

Выявленные нами изменения во включении P^{32} позволяют предположить наличие прочной связи S^{35} с белком фракции супернатант при поступлении сульфата в условиях хронического эксперимента.

Выводы

1. В условиях длительного поступления радиоактивного сульфата в дозе 1 мкк/г веса распределение активности S^{35} происходит соответственно количеству суммарного белка. Наибольшая активность приходится на фракцию ядер, затем супернатант и митохондрии.
2. При длительном поступлении $Na_2S^{35}O_4$ наблюдается уменьшение количества суммарного белка во фракции супернатанта печени от 4-го к 6-у мес. воздействия, а также в сравнении с соответствующим контролем.
3. Включение фосфора P^{32} во фракцию супернатант после 6 мес. воздействия снижается и составляет 34,1% от активности исследуемой фракции контрольной группы.

Институт гигиены труда и профессиональных заболеваний АМН СССР

Поступило 25/III 1967 г.

Տ. Լ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Թ. Լ. ՕՐԼՅԱՆՍԿԱՅԱ

ԱՅԱՐԴԻ ՍՏՐՈՒԿՏՈՒՐԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԷԼԵՄԵՆՏՆԵՐԻ ՍՓԻՏՆԵՐԻ ՄԵՋ S^{35} -Ի ՏԱՐԱԾՈՒՄԸ ՌԱԴԻՈԱԿՏԻՎ ՍՈՒԼՖԱՏԻ ԽՐՈՆԻԿԱԿԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրված է առնետների լյարդի սարուկտուրային բջիջների էլեմենտների գումարային սպիտների մեջ S^{35} -ի տարածումը՝ նրանց օրգանիզմի մեջ 2, 4 և 6 ամսվա ընթացքում, ամեն օր քաշին 1 մկկ/գ դոզայով ազդեցության սուլֆատ ներմուծելու դեպքում:

Փոխանակության պրոցեսների արագությունը որոշել ենք կենդանության ժամանակվա P^{32} շափանիչով: Միջուկները և միտոխոնդրիները առանձնացվել են scbeider-ի մեթոդով: Վերնստվածքային հեղուկը, միտոխոնդրիների նրստվածքից հետո նշել ենք որպես սուպերնատանտ:

S^{35} սուլֆատի ազդեցությունից 2 ամիս հետո գումարային սպիտի քանակը սուպերնատանտի ֆրակցիայում պակասել է, և 6 ամիս հետո այն կազմել է կոնտրոլի 60 տոկոսը: S^{35} -ի ակտիվությունը տարածվել է ըստ գումարային սպիտի քանակի, առավել ակտիվությունը նշվել է միջուկային ֆրակցիայում: Սուպերնատանտի ֆրակցիայում P^{32} -ի ակտիվությունը 6 ամիս հետո կազմել է կոնտրոլի 34,1 տոկոսը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Капланский С. Я., Кузовлева О. Б. Биохимия, 1961, 26, 4, стр. 603.
2. Левитман М. Х. Диссертация. М., 1966.
3. Монцевичюте-Эрингене Е. В. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 1964, 4, стр. 72.
4. Оганесян Н. М. Диссертация. М., 1964.
5. Хесин Р. Б. Биохимия, 1954, 19, 3, стр. 304.
6. Chapeville F. and Fromageot P. Biochem., biophys. acta, 26, 538, 1957.
7. Dziewiatkowski D. D. J. Biol. Chem., 207, 1, 181, 1954.
8. Dziewiatkowski D. D. and Di Ferrante N. J. Biol. Chem., 227, 1, 347, 1957.
9. Machlin L., Pearson P., Denton G., Bird H. J. Biol. Chem., 205, 213, 1953.
10. Sachs B. A., Siegel P. and Marino I. V. Natur, 188, 4756, 1125, 1960.
11. Schneider W. C. and Hogeboom G. H. J. Biol. Chem., 183, 1, 123, 1950.