

УДК (616.36 : 599.323.4)616-073.4-8

А. А. ЧЫРКІН (канд. мед. навук), А. Ф. ЖЛОБА

КОЛЬКАСЦЬ НІКАЦІНАМІДНЫХ НУКЛЕАТЫДАЎ У ІНТАКТНАЙ І РЭГЕНЕРЫРУЮЧАЙ ПЕЧАНІ ПАЦУКОЎ ПАД УПЛЫВАМ УЛЬТРАГУКУ

У апошнія гады з'явіліся доказы, што паміж скорасцю сінтэзу НАД і скорасцю дзялення клетак, а таксама інтэнсіўнасцю біясінтэзу нуклеінавых кіслот існуе адваротная залежнасць. Колькасць НАД у маладых хуткарастучых тканках млекакормячых аказалася больш нізкай, чым у дарослых арганізмаў; мінімальнае колькасць нікацінамідных нуклеатыдаў у рэгенерыруючай печані супадала ў часе з максімумам сінтэзу ДНК, вымеранаму па ўключэнню H^3 -тымідыну. Наадварот, павышэнне ўзроўню НАД прыводзіла да прыгнечання біясінтэзу ДНК; стымуляцыя сінтэзу НАД у рэгенерыруючай печані ўвядзеннем трыптафану і нікацінаміду суправаджалася змяншэннем інтэнсіўнасці ўключэння аратату- C^{14} у ДНК і РНК і змяншэннем колькасці ДНК. Выказана меркаванне, што прыгнечанасць біясінтэзу ДНК выклікана полімерызацыяй НАД у ядрах клетак млекакормячых у полі (АДФР) * [4, 11].

Апісаная залежнасць паміж біясінтэзам НАД і скорасцю дзялення клетак можа быць важнай метабалічнай характарыстыкай працякання рэгенерацыйнага працэсу ў тканках млекакормячых. У сувязі з гэтым мэтай нашай работы з'явілася вывучэнне колькасці нікацінамідных нуклеатыдаў у печані пацукоў у залежнасці ад характару клетачнай праліферацыі пры фізіялагічным росце, фізіялагічнай і рэпаратыўнай рэгенерацыі органа.

Матэрыял і методыка. Даследаванні праведзены на дарослых шасці-месячных пацуках (самцах) і пацучках ва ўзросце 5—7 дзён. Рэпаратыўная рэгенерацыя печані была выклікана ў дарослых пацукоў выдаленнем 2/3 органа па агульнапрынятай класічнай методыцы. Тканку печані даследавалі на 6-я суткі рэгенерацыі. Гэты тэрмін выбран таму, што ён з'яўляецца прамежковым паміж дзвюма фазамі аднаўлення масы органа — першасным перыядам падрыхтоўкі да дзялення, інтэнсіўным дзяленнем гепатацытаў у першыя 3 сутак і перыядам гіпертрафіі клетак, які пачынаецца з 7-га дня пасля частковай гепатэктаміі [1]. Фізіялагічная рэгенерацыя ў інтактнай печані дарослых пацукоў была стымулявана пяціразовым уздзеяннем ультрагуку інтэнсіўнасцю $0,2 \text{ Вт/см}^2$ [5] з сутачнымі інтэрваламі. Выкарыстаны два рэжымы ўздзеяння: імпульсны ультрагук (ІУГ) — частата праходжання імпульсаў 50 Гц, працягласць кожнага імпульсу 10 мс і пульсуючы ультрагук (ПУГ) — фарміраванне ультрагукавых імпульсаў з частатой 50 Гц і працягласцю 10 мс у групы імпульсаў, якія праходзяць з інфрагукавай частатой ($6 \pm \pm 10\%$ Гц), што адпавядае частаце сардэчных скарачэнняў. Абодва рэжымы ўздзеяння былі прыменены для стымуляцыі працэсаў рэпаратыўнай рэгенерацыі печані [3]. Гэта дасягалася з дапамогай пяціразовага

* Полі (АДФР) — полі (адэназіндыфасфатрыбоза).

ўздзеяння ультрагуку ў першыя пяць дзён пасля аперацыі частковай гепатэктаміі ў дарослых пацукоў. Гканку печані даследавалі праз 24 гадз. пасля заключнай працэдуры агучвання, г. зн. на 6-я суткі рэгенерцыі органа.

Колькасць нікацінамідных нуклеатыдаў у тканцы печані вызначалі з дапамогай флюараметрычнага метаду Лоуры і сааўтараў [9] ў мадыфікацыі І. Гільгертавай [2]. Для павышэння дакладнасці і ўзнаўляльнасці метаду былі ўведзены змяненні на першых двух этапах вызначэння нікацінамідных нуклеатыдаў. На першым этапе ў кіслае экстракцыйнае асяроддзе, якое змяшчала 0,5 мл 1 н. HCl і 3,5 мл 0,1 М трысбуферу, дабаўлена 0,5 мл насычанага раствору сернакіслага натрыю; у шчолачнае экстракцыйнае асяроддзе, якое ўключала 0,5 мл 1 н. NaOH, 4,0 мл 0,1 М трысбуферу, унесен цыстэін да канчатковай канцэтрацыі 0,5 М. Гэтыя дабаўкі прызначаны для павышэння выхаду нікацінамідных нуклеатыдаў за кошт інгібіравання надаз і аўтаакісляльных працэсаў [7, 8].

На другім ферментатыўным этапе пры рабоце са шчолачнымі экстрактамі, якія змяшчалі НАДН і НАДФН, праведзена неспецыфічнае акісленне адноўленых форм нікацінамідных нуклеатыдаў феназінметасульфатам [10], што дазволіла адмовіцца ад выкарыстання камерцыйных прэпаратаў алкагольдэгідрагеназы, якія даюць эффект недаакіслення або недааднаўлення НАД на 10—15% у сістэмах алкагольдэгідрагеназа — спірт і алкагольдэгідрагеназа — ацэтальдэгід. Акрамя таго, уяўленне феназінметасульфату дазволіла на ферментатыўным этапе выкарыстаць толькі адну ферментатыўную глюкоза-6-фасфатдэгідрагеназную рэакцыю, якая забяспечвае максімальна магчымае ператварэнне НАДФ⁺ у НАДФН.

Ход аналізу наступны. Наважкі печані па 200 мг хутка змяшчалі ў два шклянныя гомагенізатары з падагрэтымі да 95—100° кіслай і шчолачнай экстракцыйнымі сумесямі. Пасля 30-секунднага раздрабнення гомагенаты замарожвалі і да наступных этапаў вызначэння захоўвалі пры —30°. У шчолачным экстракце пасля размарожвання даводзілі значэнні рН да 8,2, пасля чаго прыбаўлялі 0,02 мл 20 мг % раствору феназінметасульфату. За час рэакцыі (10 мін) адбываецца акісленне НАДН і НАДФН у НАД⁺ і НАДФ⁺. У гэты час асцярожна размарожвалі кіслы экстракт, які змяшчае НАД⁺ і НАДФ⁺; велічыню рН даводзілі да 8,2. Далейшыя працэдуры былі аднолькавыя для абодвух экстрактаў: давядзенне аб'ёмаў да 10 мл 0,1 М трысбуферам рН 8,2, цэнтрафугаванне пры 18 000 g, 0—2°, 20 мін. Да 2,5 мл супернатанту з кожнага экстракту дабаўлялі па 0,02 мл 0,08 М раствору натрыевай солі глюкоза-6-фасфату і 0,02 мл (5мкг) раствору глюкоза-6-фасфатдэгідрагеназы; рэакцыю працягвалася 30 мін пры 25°. У выніку пробы з «кіслага экстракту» змяшчала НАД⁺ і НАДФН (з сапраўднага НАДФ⁺), а проба з «шчолачнага экстракту» — НАДФН і НАД⁺ (з сапраўднага НАДН). Апошні этап вызначэння — канчатковае кіслотна-шчолачнае раздзяленне і флюарэсцэнцыя ў сумесі NaOH—H₂O₂ — праводзілі ў поўнай адпаведнасці з рэкамендацыямі І. Гільгертавай [2].

Флюарэсцэнцыю рэгістравалі на спектрафотафлюараметры МПФ-2А фірмы Хітачы. У рабоце выкарыстаны НАД⁺, НАДН, НАДФ⁺ і НАДФН фірм Рэанал і Бёрынгер, глюкоза-6-фасфатдэгідрагеназа фірмы Флука (Швейцарыя), феназінметасульфат фірмы Шухардт (ФРГ).

Увесь лічбавы матэрыял апрацаван статыстычна.

Атрыманьня рэзультаты і абмеркаванне. Пры фізіялагічным росце і рэпаратывнай рэгенерцыі сумарная колькасць нікацінамідных нуклеатыдаў у печані зніжана на 41,8 і 48,7% адпаведна ў параўнанні з іх колькасцю ў печані шасцімесячных пацукоў (табліца). Гэта зніжэнне адбы-

Колькасць нікацінамідных нуклеатыдаў у печані пацукоў, нМ/г

Група жывёлін	НАД ⁺	НАДН	НАДФ ⁺	НАДФН
Кантроль, пацукі 6 мес.	491 ± 44,7	322 ± 24,2	125 ± 5,5	290 ± 30,4
Пацукі, 5—7 дзён P	224 ± 12,8 <0,001	395 ± 41,9 >0,1	39 ± 6,0 <0,001	208 ± 23,0 =0,05
Рэгенерация, пацукі 6 мес. P	322 ± 27,6 <0,01	274 ± 42,0 >0,2	59 ± 6,8 <0,001	171 ± 18,5 <0,01
ІУГ, пацукі 6 мес. P	402 ± 40,0 >0,1	370 ± 25,6 >0,1	120 ± 20,1 >0,5	198 ± 10,9 <0,02
ПУГ, пацукі 6 мес. P	441 ± 32,2 >0,2	317 ± 25,6 >0,5	101 ± 11,2 0,1—0,05	154 ± 15,2 <0,01
Рэгенерация+ІУГ P	334 ± 35,3 <0,02	348 ± 35,2 >0,5	122 ± 16,5 >0,5	95 ± 13,2 <0,001
Рэгенерация+ПУГ P	523 ± 98,4 >0,5	284 ± 16,5 >0,2	115 ± 29,1 >0,5	157 ± 11,9 <0,01

Заўвага. У кожнай групе ад 6 да 9 жывёлін.

лося галоўным чынам за кошт акісленых форм нуклеатыдаў, таму што адносіны НАД⁺+НАДФ⁺/НАДН+НАДФН зніжаюцца з 1,01 у печані дарослых пацукоў да 0,44 і 0,86 у печані пацучкоў і пры рэпаратывнай рэгенерации органа. Адносная перавага адноўленых форм нікацінамідных нуклеатыдаў над акісленымі звязана, відаць, з актывацыяй глікалітычных ператварэнняў вугляводаў і некаторай гіпаксіяй, характэрных для хуткарастучых тканак [1]. Як у печані пацучкоў, так і на 6-я суткі рэгенерации органа выяўлена павышэнне адносін НАД⁺+НАДН/НАДФ⁺+НАДФН да 2,50 і 2,59 у параўнанні з 1,96 у інтактнай печані шасцімесячных пацукоў. Змяншэнне сумарнай колькасці акісленай і адноўленай форм НАДФ адбылося ў асноўным за кошт НАДФ⁺. Відаць, у хуткарастучых тканках першаступеннае значэнне набывае аднаўленне НАДФН, неабходнага для рада біясінтэзаў, у тым ліку і для біясінтэзу нуклеінавых кіслот; акрамя таго, вядома, што ферментатывная дэструкцыя НАДФН працякае значна слабей, чым НАДФ⁺ [6]. Такім чынам, праліферацыя клетак печані, абумоўленая фізіялагічным ростам і рэпаратывнай рэгенерацияй органа, спалучана са зніжэннем колькасці НАД⁺, НАДФ⁺ і НАДФН. У гэтым можна бачыць пацвярджэнне таго, што біясінтэз НАД заповолен у той перыяд жыцця, калі адбываецца актывнае дзяленне клетак [4].

Стан фізіялагічнай рэгенерации інтактнай печані, выкліканы ультрагукам, істотна адрозніваецца ад фізіялагічнага росту і рэпаратывнай рэгенерации органа адсутнасцю прыкметнага памяншэння ўзроўня НАД⁺ і НАДФ⁺, хоць колькасць НАДФН зніжана. Гэтыя змяненні адпавядаюць таму, што прыкметамі фізіялагічнай рэгенерации печані з'яўляецца не клетачная праліферацыя, а ажыўленне метабалізму, утварэнне двух'ядзерных клетак і поліплаідыя. Усе гэтыя працэсы прама або ўскосна звязаны з ператварэннямі НАДФН.

Сумарная колькасць нікацінамідных нуклеатыдаў у печані пацукоў зніжана ў большай ступені пасля дзеяння пульсуючага ультрагуку (21,2%), чым імпульснага (12,6%). Уздзеянне пульсуючым ультрагукам выклікала значнае змяншэнне ўзроўню НАДФН і, акрамя таго, нязначнае зніжэнне колькасці НАДФ⁺. Зыходзячы з гэтага, можна меркаваць, што пульсуючы ультрагук аказвае больш выражаны ўплыў на метабалічныя працэсы, звязаныя з рэгенерацияй.

Для пацвярджэння гэтага меркавання былі пастаўлены доследы на пацуках, у якіх выдалялі 2/3 печані. Пяціразовае ўздзеянне ультрагукам паскарала прырост масы печані. Пры гэтым пульсуючы ультрагук быў больш эфектыўны, чым імпульсны: на 6-я суткі рэгенерацыі вага печані ў пераліку на 100 г вагі цела складала ў кантролі $3,19 \pm 0,145$ г, пры дзеянні імпульснага ультрагуку $3,77 \pm 0,137$ г ($P < 0,02$) і пры дзеянні пульсуючага ультрагуку $4,12 \pm 0,090$ г ($P < 0,001$). Розніца ў масе печані ў пацукоў, агучаных ІУГ і ПУГ, аказалася верагоднай ($P = 0,05$). Такім чынам, пульсуючы ультрагук садзейнічаў больш хуткаму аднаўленню масы печані да ўзроўню, характэрнага для інтактных пацукоў таго ж узросту. Гэта аднаўленне масы органа спалучана з нармалізацыяй мітагучнай актыўнасці гепатацытаў і спектра нікацінамідных нуклеатыдаў. У рэгенерыруючай печані пацукоў, падвергнутых дзеянню ПУГ, было выяўлена зніжэнне колькасці толькі НАДФН. Апошняе адлюстроўвае, відаць, узмацненне біясінтэтычных працэсаў у гепатацытах у гіпертрафічную фазу рэгенерацыі печані, падобных такім пры стымуляцыі фізіялагічнай рэгенерацыі. Наадварот, пры дзеянні ІУГ у рэгенерыруючай печані пацукоў аказалася зніжанай не толькі колькасць НАДФН, але і НАД⁺, а сумарная колькасць нікацінамідных нуклеатыдаў зменшана на 36,6%. Усё гэта прыкметы працягваючага росту масы органа за кошт клетачнай праліферацыі.

Такім чынам, на 6-я суткі рэпаратывунай рэгенерацыі знойдзена, што ў печані кантрольных шасцімесячных пацукоў зніжана колькасць НАД⁺, НАДФ⁺ і НАДФН, пры дзеянні імпульснага ультрагуку НАД⁺ і НАДФН і пры дзеянні пульсуючага ультрагуку толькі НАДФН. Пры гэтым ступень нармалізацыі спектра нікацінамідных нуклеатыдаў печані карэлюе са ступенню нармалізацыі масы органа. Таму можна рэкамендаваць выкарыстанне вызначэння спектра нікацінамідных нуклеатыдаў для ацэнкі рэгенерацыйнага працэсу.

Агульным для ўсіх вивучаемых паказчыкаў — фізіялагічны рост печані, фізіялагічная і рэпаратывуная рэгенерацыя органа — з'явілася зніжэнне ўзроўню НАДФН. Мы схільны бачыць у гэтым прыкмету інтэнсіўна працякаючых біясінтэтычных працэсаў, неабходных пры клетачным дзяленні, гіпертрафіі, поліплаідызацыі і г. д. Інтымныя механізмы выяўленага эфекту, і ў прыватнасці амаль трохразовае зніжэнне ўзроўню НАДФН у рэгенерыруючай печані пацукоў пры дзеянні імпульснага ультрагуку, патрабуюць далейшага вивучэння.

Вывады

1. Пры фізіялагічным росце і рэпаратывунай рэгенерацыі печані выяўлены аднатыповыя змяненні ў колькасці нікацінамідных нуклеатыдаў, якія выражаюцца ў змяншэнні колькасці НАД⁺, НАДФ⁺ і НАДФН.

2. Стымуляцыя фізіялагічнай рэгенерацыі інтактнай печані ультрагукам спалучана з памяншэннем узроўню НАДФН.

3. Больш хуткай рэпаратывунай рэгенерацыі печані пад уплывам пульсуючага ультрагуку ў параўнанні з імпульсным адпавядае хутчэйшая нармалізацыя колькасці НАД⁺.

Літаратура

1. Бреслер В. М., Черногрядская Н. А., Пильщик Е. М. и др. Нормальная и патологическая цитология паренхимы печени. Л., 1969.
2. Гильгертова И. В кн. «Пентозный цикл и ионизирующая радиация». Л., 86, 1968.
3. Лейкин И. Г., Чиркин А. А. В кн. «Ультразвук в физиологии и медицине», т. 1. Ульяновск, 1975, стр. 66.

4. Чаговец Р. В., Шушевич С. И., Халмурадов А. Г. Укр. біохім. журн., 47, 5, 635, 1975.
5. Чиркин А. А. В кн. «Ультразвук в физиологии и медицине», т. 1. Ульяновск, 1975 стр. 34.
6. Шонка И. В кн. «Пентозный цикл и ионизирующая радиация». Л., 1968, стр. 9
7. Bassham J. A., Birt L. M., Hems R. et al. Biochem. J., 73, 3, 491, 1959.
8. Jouany P. J.-M. Ann. Biol. clin., 23, 10—12, 1097, 1965.
9. Lowry O. H., Roberts N. R., Kappahn J. I. J. Biol. Chem., 224, 2, 1047, 1957.
10. Sokal J. A., Tarkowski S., Wronska-Nofer T. Acta Biochimica Polonica, 16, 1, 1, 1969.
11. Streffer Ch., Scholz G. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 12, 1855, 1972.

*Витебский медицинский
институт*