УДК 612.357.71:615.217.22

О. М. Харламова

ВПЛИВ ОКСИТОЦИНУ І НОРАДРЕНАЛІНУ НА АКТИВНІСТЬ Na, K ТА Mg АТФаз МІКРОСОМАЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ ЕПІТЕЛІЮ ЖОВЧНОГО МІХУРА СВИНІ

Дослідженнями ряду авторів встановлено, що гормони нейрогіпофіза і катехоламіни беруть участь у регуляції процесів транспорту ізотонічної рідини епітелієм жовчного міхура [1, 5, 7]. Показано також, що при гальмуванні окситоцином транспортної функції жовчного міхура (ЖМ) спостерігається паралельне зниження активності Na, K АТФази клітин епітелію [2, 3]. В зв'язку з цим становило інтерес вивчити вплив окситоцину і норадреналіну на систему Na, K АТФази епітеліальних клітин жовчного міхура.

Методика досліджень

Об'єктом досліджень служили епітеліальні клітини ЖМ свині, з гомогенату яких одержували фракцію мікросом з допомогою методу, описаного Солінгер та Гонзалец [16]. Для цього брали 10—12 ЖМ, розрізали, багато разів промивали розчином Кребса з 2 *ммоль* ЕДТА і робили зіскоб епітеліальних клітин, які занурювали в 100 *мл* розчину Кребса з 2 *ммоль* ЕДТА та центрифугували в рефрижераторній центрифузі К-24 (температура 0—2° С) при 10 000 *g* 15 *хв*. Одержаний осад гомогенізували і суспензували в 50 *мл* 0,25 *М* розчину сахарози з 1 *ммоль* ЕДТА та 0,1% дезоксихолату Na, потім центрифугували при 65 000 *g* на протязі 1 *год*. Осад повторно суспензували і гомогенізували, після чого доводили до об'єму 25 *мл* 0,25 *М* сахарозою з 1 *ммоль* ЕДТА та 0,5% дезоксихолату Na (pH 7,2). Потім суспензію центрифугували 20 *хв* при 20 000 *g*, а супернатант — при 65 000 *g* 60 *хв* в ультрацентрифузі VAK-60. Кінцевий осад гомогенізували і суспензували в 3 *мл* 1 *мМ* розчину ЕДТА (pH 7,3). Одержану суспензію мікросом зберігали на протязі 7—10 днів при температурі —2 — 5° С, використовуючи її як ферментний матеріал для визначення активності Na, K АТФази.

Концентрацію білка в гомогенаті та мікросомальній фракції визначали за методом Лоурі [12]. Активність загальної, Mg, Na, K АТФаз визначали за методом Кортаса [4] в модифікації [3].

Для дослідження загальної АТФази склад інкубаційного середовища був таким (ммоль): NaCl — 100, KCl — 20, $MgCl_2$ — 2,0, NaАТФ — 2,0, гістидин — 40,0 (pH 7,4). До середовища додавали 0,1—0,3 *мл* ферментного матеріалу (фракцію мікросом), який включав 50—150 *мкг* білка, та інкубували на протязі 20 *хв* при температурі 37° С.

В пробах для визначення Mg АТФази склад інкубаційного середовища був той же, за винятком того, що 20 *ммоль* KCl заміщували на NaCl. В ряді проб до цього середовища додавали оуабаїн ($1 \cdot 10^{-4}$ *моль*). АТФазну активність виражали кількістю мікромолей $P_н$, звільненого з АТФ при її інкубації з 1 *мг* білка ферментної суспензії на протязі 1 *год*. $P_н$ визначали за методом Фіске [10]. Окситоцин в дозах 1, 4, 20 міліодиниць/*мл* (*мОд/мл*) додавали в середовище, в якому відбувався ферментативний гідроліз АТФ, туди ж вносили і норадреналін ($3 \cdot 10^{-8}$ і $3 \cdot 10^{-5}$ *моль*).

Результати досліджень

Дані контрольних дослідів показали, що активність Mg АТФази в тканинному гомогенаті і мікросомальній фракції приблизно однакова. Активність Na, K АТФази, навпаки, зростає в 14,8 разів в мікросомальній фракції, в порівнянні з гомогенатом (табл. 1). Окситоцин в дозі 1 *мОд/мл*, внесений в середовище інкубації ферментної суспензії з АТФ,

не викликає достовірних з
мальної фракції, тоді як
приводили до виразного г
тивності зростало в міру
внесенні в середовище 4 л
жувалась у середньому
20 *мОд/мл* — на 40% (р
АТФазу. Під впливом об
стала в два рази в порівня

При внесенні в середо
щилась активність Na, K
центрації медіатора до 3·
K АТФази на 16,8% (з 20

Обговор

Проведені досліджен
росомальної фракції епіт
білка/*год*. Приблизно так
епітеліальних тканинах: в
год [13], щура — 21,1 *мк*
ника кролика — 33,0 *мкмо*
альних тканин виявлені б
АТФази; так, активність і
пахи дорівнює 64 *мкмолі*
слинної залози щура —
АТФази в мікросомальній
нюється в порівнянні з г
зростає в 14,8 рази. Анал
системи в мікросомальній
ші автори [8, 9, 11, 14].
який вміщує уламки кл
мембран [20]. Тому ви
тивність Na, K АТФази
фракції свідчить про лока
Na, K АТФазної фермен
стеми в поверхневих ме
клітин. Na, K АТФазна
в мікросомах жовчного
не була вивчена біохім
цього часу.

Одержаний в наведен
ті експериментальний м
вказує на те, що Na, K
мікросомальної фракції
ЖМ свині, як і Na, K АТФ
би [3], має високу чутлив
ше проведені дослідження
ни епітелію ЖМ жаби ви
всмоктування ізотонічної
ту клітин. Але тісний коре
ще не свідчить про наявн
на гомогенат клітин епіте
метаболізму. Так показан
перенесення іонів Na в ізо
зміною внутріклітинного ф

не викликає достовірних змін активності ні Mg, ні Na, K АТФаз мікросомальної фракції, тоді як більш високі дози гормона (4 та 20 *мОд/мл*) приводили до виразного гальмування цих показників, а гальмування активності зростало в міру збільшення дози гормона (табл. 2). Так, при внесенні в середовище 4 *мОд/мл* гормона активність Na, K АТФази знижувалась у середньому на 34,8% ($p<0,01$), а після додавання 20 *мОд/мл* — на 40% ($p<0,001$). Одночасно гормон активував Mg АТФазу. Під впливом обох доз окситоцину активність Mg АТФази зростала в два рази в порівнянні з контролем ($p<0,001$).

При внесенні в середовище норадреналіну в дозі $3\cdot10^{-8}$ *моль* підвищилась активність Na, K АТФази на 23,1% ($p<0,01$). Збільшення концентрації медіатора до $3\cdot10^{-5}$ *моль* викликало зменшення активності Na, K АТФази на 16,8% (з 20,3 до 16,9 *мкмоль* $P_н$/*мг* білка/*год*) (табл. 3).

Обговорення результатів досліджень

Проведені дослідження показали, що активність Na, K АТФази мікросомальної фракції епітелію ЖМ свині становить 35,7 *мкмоль* $P_н$/*мг* білка/*год*. Приблизно такої ж величини вона досягає в інших залозисто-епітеліальних тканинах: в корі нирки собаки — 26,5 *мкмоль* $P_н$/мг білка/*год* [13], щура — 21,1 *мкмоль* $P_н$/*мг*/*год* [6], в епітелії тонкого кишечника кролика — 33,0 *мкмоль* $P_н$/*мг*/*год* [18]; водночас у деяких з епітеліальних тканин виявлені більш високі активності мікросомальної Na, K АТФази; так, активність її в мікросомах епітелію сечового міхура черепахи дорівнює 64 *мкмоль* $P_н$/*мг*/*год* [15], а в мікросомах підщелепної слинної залози щура — 133,0 *мкмоль* $P_н$/*мг*/*год* [17]. Активність Mg АТФази в мікросомальній фракції епітелію ЖМ свині практично не змінюється в порівнянні з гомогенатом, тоді як активність Na, K АТФази зростає в 14,8 рази. Аналогічне збільшення активності, Na, K АТФазної системи в мікросомальній фракції епітеліальних тканин спостерігали інші автори [8, 9, 11, 14]. Відомо, що мікросомальна фракція — це осад, який вміщує уламки клітинних мембран [20]. Тому висока активність Na, K АТФази в цій фракції свідчить про локалізацію Na, K АТФазної ферментної системи в поверхневих мембранах клітин. Na, K АТФазна система в мікросомах жовчного міхура не була вивчена біохімічно до цього часу.

Таблиця 1

АТФазна активність клітин епітелію жовчного міхура свині (M±m)

Фракції	*n*	АТФаза (*мкмоль* $P_н$/*мг*/*год*)		
		Загальна	Mg	Na, K
Гомогенат	3	7,0±0,68	4,9±0,46	2,4±0,62
Мікросоми	5	41,7±6,8	6,0±0,6	35,7±6,0

Одержаний в наведеній статті експериментальний матеріал вказує на те, що Na, K АТФаза мікросомальної фракції епітелію ЖМ свині, як і Na, K АТФаза гомогенату епітеліальних клітин ЖМ жаби [3], має високу чутливість до дії окситоциту та норадреналіну. Раніше проведені дослідження [3] показали, що вплив окситоцину на клітини епітелію ЖМ жаби викликає сполучене гальмування швидкості всмоктування ізотонічної рідини та активності Na, K АТФази гомогенату клітин. Але тісний корелятивний зв'язок, встановлений між ними [19], ще не свідчить про наявність причинного зв'язку, оскільки дія гормона на гомогенат клітин епітелію ЖМ може приводити до змін їх іонного метаболізму. Так показано, що вплив окситоцину на трансцелюлярне перенесення іонів Na в ізольованому ЖМ жаби може бути обумовлений зміною внутріклітинного фонду Na [2]. В дослідженнях, проведених на

Таблиця 2

Вплив різних доз окситоцину на АТФазну активність мікросомальної фракції клітин епітелію жовчного міхура свині ($M \pm m$)

Показники	n	АТФаза (*мкмоль* $P_н$ мг/год		Зміни активності АТФаз (в %)	
		Mg	Na, K	Mg	Na, K
Контроль	5	6,0±0,6	35,7±6,0	—	—
Окситоцин (*мОд/мл*)					
1	3	8,1±2,1	33,5±8,5	+35,0	—6,2
p		<0,5	<0,5	<0,2	<0,5
4	3	12,4±2,0	23,3±8,5	+105,5	—34,8
p		<0,02	<0,05	<0,01	<0,01
20	5	11,8±0,7	22,2±2,5	+91,3	—40,1
p		<0,001	<0,05	<0,001	<0,001

Таблиця 3

АТФазна активність мікросомальної фракції епітелію жовчного міхура свині при дії норадреналіну (M±m)

Показники	n	АТФаза (мкмоль $P_н$/*мг/год*)		Зміни активності АТФаз (в%)	
		Mg	Na, K	Mg	Na, K
Контроль	8	9,4±1,4	20,3±2,7	—	—
Норадреналін $3 \cdot 10^{-8}$ *моль*	8	7,7±0,7	25,0±2,1	—4,2	+23,1
p		<0,5	<0,01	>0,5	<0,01
$3 \cdot 10^{-5}$ *моль*	8	8,5±0,8	16,9±1,6	+1,6	—16,8
p		>0,5	<0,05	>0,5	<0,02

клітинному гомогенаті, йшлося про дію гормона на клітини. Аналіз наведених експериментальних даних дає можливість заключити, що окситоцин впливає на ізольовані поверхневі мембрани клітин у вигляді мікросомальної фракції ЖМ свині. Отже, високий ступінь гальмування активності Na, K АТФази в цій фракції може свідчити про безпосередню дію гормона на ту субстанцію мембран епітеліальних клітин, в якій локалізована Na, K АТФазна ферментна система.

Література

1. *Яременко М. С., Бутусова И. А.* Нейрогуморальный контроль за интенсивностью всасывания изотонической жидкости из полости желчного пузыря.— Материалы III Всесоюз. симпозиума по физиологии и патологии всасывания в желудочно-кишечном тракте. Одесса, 1973, с. 148.
2. *Яременко М. С., Бутусова И. А.* Содержание электролитов и воды в стенке желчного пузыря лягушки при всасывании изотонической жидкости.— Физиол. журн. СССР, 1976, **62**, № 2, с. 275—282.
3. *Яременко М. С., Харламова О. Н.* О механизме тормозящего действия окситоцина на транспорт изотонической жидкости эпителием желчного пузыря.— Бюл. эксперим. биол. и мед., 1974, **78**, № 11, с. 10—12.
4. *Cortas N., Walser M.* (Na, K) — activated ATPase in isolated mucosal Cells of Toad Bladder.— Biochim. et biophys. acta, 1971, **249**, p. 181—187.
5. *Cremaschi D. e. a.* Effect of neurohypophyseal Hormones and their Mechanism of Action on Gall—Bladder Water Transport.— Arch. intern. physiol., et biochem., 1968, **76**, p. 813—822.

6. *De Santo N. G., Ebel H* Pflügers Arch., 1971, 324
7. *Diamond J. M.* The re don), 1962, **161**, p. 442—
8. *Ebel H., De Santo N.* Pflügers Arch., 1971, 324
9. *Hendler E. D., Torrett* activated Adenosine Tr Invest., 1971, **50**, p. 1329
10. *Fiske C. H., Subbarow* Chem., 1925, **66**, p. 375—
11. *Katz A. J., Genant H.* and Medullary Na, K
12. *Lowry O. H. e. a.* Pr Chem., 1951, **193**, p. 265-
13. *Martinez-Maldonado M* Sodium—Potassium — Therap., 1974, **188**, N 3,
14. *Michiya Fujita e. a.* Membranes from intest symes and Ouabain — p. 336—347.
15. *Shamoo Y. E., Brodsky* sal Cells of Turtle Bla
16. *Solinger R. E. e. a.* E Turtle Bladder.— Amer.
17. *Schwartz A., Moore C.* bearing on Salivary
18. *Richardson S. H.* An paration and Properti acta, 1968, **150**, p. 572—
19. *Van Os C. H., Sleger* Activities and the Ra Biochim. et biophys. ac
20. *Whittam R.* The asym in Relation to active

Відділ фізіології водно-с Інституту фізіології ім. О АН УРСР, К

EFFEC
ON ACTIVIT
FRACTI

The activity of Na, differential centrifugation as affected by different d of enzyme incubation wit of pig gallbladder epithel activity of Na, K, ATPas no changes in the enzyma up to 4 and 20 mU/ml lea activation of Mg ATPas dose of $3 \cdot 10^{-5}$ M decreas

Department of Physiology the A. A. Bogo of Physiology, Ac Ukrainian

6. *De Santo N. G., Ebel H., Hierholzer K.* Plasma Cell Membranes of the Rat Kidney.— Pflügers Arch., 1971, **324**, s. 26—42.
7. *Diamond J. M.* The reabsorbtive Function of the Gall—Bladder.— J. Physiol. (London), 1962, **161**, p. 442—473.
8. *Ebel H., De Santo N. G., Hierholzer K.* Plasma Cell Membranes of the Rat Kidney.— Pflügers Arch., 1971, **324**, s. 1—25.
9. *Hendler E. D., Torretti J., Epstein F. H.* The Distribution of Sodium—Potassium—activated Adenosine Triphosphatase in Medulla and Cortex of the Kidney.— J. Clin. Invest., 1971, **50**, p. 1329—1337.
10. *Fiske C. H., Subbarow Y.* The colorimetric Determination of Phosphorus.— J. Biol. Chem., 1925, **66**, p. 375—400.
11. *Katz A. J., Genant H. K.* Effect of extracellular Volume Expansion on Renal Cortical and Medullary Na, K ATPase.— Pflügers Arch., 1971, **330**, p. 136—148.
12. *Lowry O. H. e. a.* Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.— J. Biol. Chem., 1951, **193**, p. 265—275.
13. *Martinez-Maldonado M. e. a.* Interactions of Digoxin and Ethacrynik Acid with renal Sodium—Potassium — activated Adenosine Triphosphatase.— J. Pharmacol. and Exp. Therap., 1974, **188**, N 3, p. 605—614.
14. *Michiya Fujita e. a.* Differential Isolation of Microvillous and basolateral plasma Membranes from intestinal Mucosa: mutually exclusive Distribution of digestive Ensymes and Ouabain — sensitive ATPase.— Biochim. et biophys. acta, 1972, **274**, p. 336—347.
15. *Shamoo Y. E., Brodsky W. A.* The (Na, K) — dependent ATPase in the isolated mucosal Cells of Turtle Bladder.— Biochim. et biophys. acta; 1970, **203**, p. 111—123.
16. *Solinger R. E. e. a.* Effect of Ouabain on Ion Transport Mechanisms in the isolated Turtle Bladder.— Amer. J. Physiol., 1968, **215**, p. 249—261.
17. *Schwartz A., Moore C. A.* Highly active Na, K—ATPase in Rat Submaxillary Gland bearing on Salivary Secretion.— Amer. J. Physiol., 1968, **214**, N 5, p. 1163—1167.
18. *Richardson S. H.* An Ion Translocase System from Rabbit intestinal Mucosa. Preparation and Properties of the (Na, K) — activated ATPase.— Biochim. et biophys. acta, 1968, **150**, p. 572—577.
19. *Van Os C. H., Slegers J. F. G.* Correlation between (Na, K) — activated ATPase Activities and the Rate of isotonic Fluid Transport of Gall Bladder Epithelium.— Biochim. et biophys. acta, 1971, **241**, p. 89—96.
20. *Whittam R.* The asymmetrikal Stimulation of a membrane Adenosine Triphosphatase in Relation to active Cation Transport.— Biochem. J., 1962, **84**, p. 110—118.

Відділ фізіології водно-сольового обміну
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
АН УРСР, Київ

Надійшла до редакції
10.VI 1976 р.

O. N. Kharlamova

EFFECT OF OXYTOCIN AND NOREPINEPHRINE ON ACTIVITY OF Na, K AND Mg ATPases IN MICROSOMAL FRACTION OF PIG GALLBLADDER EPITHELIUM

Summary

The activity of Na, K and Mg ATPases in the microsomal fraction obtained by differential centrifugation from the epithelial cells of pig isolated gallbladder was studied as affected by different doses of oxytocin and norepinephrine introduced to the medium of enzyme incubation with ATP. The activity of Mg ATPase in the microsomal fraction of pig gallbladder epithellium does not change as compared to homogenate whereas the activity of Na, K, ATPase is 14.8 times as high. Oxytocin in a dose of 1 mU/ml causes no changes ir the enzymatic activity. An increase in hormone concentration in the medium up to 4 and 20 mU/ml leads to a noticeable inhibition of Na, K, ATPase with simultaneous activation of Mg ATPase. Norepinephrine in a dose of $3 \cdot 10^{-8}$ M increases and in a dose of $3 \cdot 10^{-5}$ M decreases the Na, K ATPase activity and has no effect on Mg ATPase.

Department of Physiology of Water-Salt Metabolism,
the A. A. Bogomoletz Institute
of Physiology, Academy of Sciences,
Ukrainian SSR, Kiev