

УДК 612.015.1:612.357.71

М. С. Яременко, О. Н. Харламова

НСО₃⁻ АТФаза КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ КРОЛИКА

Согласно данным целого ряда исследований, в клетках различных секреторных органов, таких как слизистая желудка [5, 10, 14, 15, 16], поджелудочная железа [19, 23], подчелюстная слюнная железа [9, 17], проксимальные почечные канальцы [2, 11], печень [6, 8]; кроме того в ткани селезенки, головного мозга и в эритроцитах [2, 3] находится НСО₃⁻ стимулируемая, Mg⁺⁺ зависимая АТФаза. Есть основания полагать, что наличие НСО₃⁻ АТФазы в секреторных клетках связано с ее участием в мембранном транспорте НСО₃⁻ [9, 15, 17, 19].

Поскольку в процессе концентрирования желчи [21] клетки эпителия желчного пузыря также осуществляют активный транспорт НСО₃⁻, то не исключено, что данная ферментная система содержится и в этих клетках.

Представляло интерес попытаться выявить наличие НСО₃⁻ стимулируемой АТФазы в клетках эпителия желчного пузыря.

Методика исследований

Исследования проведены на желчных пузырях кроликов. Удаленный пузырь разрезали, промывали несколько раз охлажденным буферным раствором (250,0 ммоль сахарозы, 2,5 ммоль ЭДТА, 40,0 ммоль трис-НСl, 30,0 ммоль гистидина, 2,4 ммоль Na-дезоксиколата, pH 7,4) и помещали в этот же раствор, охлажденный до 0—2° С, на 10—15 мин. Затем со стенки пузыря производили соскоб слизистой с помощью стеклянного слайда, и ткань гомогенизировали в 2,0—4,0 мл раствора. 0,1—0,2 мл гомогената, содержащего 100—150 мкг белка, вносили в среду с 2,0 ммоль АТФ, 2,0 ммоль MgCl₂, 40,0 ммоль трис-НСl буфера (pH 7,4) и 20 ммоль NaHCO₃ или NH₄HCO₃. Контролем служила среда, в которой ионы НСО₃⁻ отсутствовали. Смесь в объеме 1,5 мл инкубировали в течение 20 мин при 37° С. Реакцию останавливали добавлением к каждой пробе 1,5 мл 5% трихлоруксусной кислоты. В надосадочной жидкости определяли фосфор неорганический (Р_н) по методу Фiske [7], содержание белка — по Лоури [13].

В ряде опытов определяли также активность Na⁺, K⁺ АТФазы, используя две среды. Одна содержала 100 ммоль Na⁺, 20 ммоль K⁺ [4], а другая — 20 ммоль Na⁺ при отсутствии K⁺ (последняя служила для определения активности НСО₃⁻ АТФазы).

Для изучения влияния оубаина на активность НСО₃⁻ АТФазы его добавляли к инкубационной среде в дозах 1·10⁻⁴; 1·10⁻³ и 1·10⁻² моль. В ряде опытов в инкубационную среду вносили этакриновую кислоту, создавая концентрацию, равную 1·10⁻⁴; 3·10⁻⁴; 5·10⁻⁴; 1·10⁻³; 2·10⁻³ моль.

Результаты исследований

Результаты исследований показали, что в среде, содержащей 20 ммоль Na⁺ и при отсутствии ионов K⁺, активность НСО₃⁻ АТФазы в клетках эпителия желчного пузыря кролика составляет 7,5, Na⁺, K⁺ АТФазы — 1,7 и Mg⁺⁺ АТФазы — 27,0 мкмоль Р_н/мг белка/ч. В среде, содержащей 100 ммоль Na⁺, активность Na⁺, K⁺ АТФазы равнялась 10,8, а Mg⁺⁺ — 20,8 мкмоль Р_н/мг белка/ч.

концентрации Na⁺ в инкубационной среде. Так, при полной замене Na⁺ на NH₄⁺ и сохранении постоянной концентрации HCO₃⁻ в инкубационной среде, активность HCO₃⁻ АТФазы значительно снижается. Это снижение может быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, удаление Na⁺ из инкубационной среды приводит к исчезновению активности Na⁺,K⁺ АТФазы, которая может суммироваться с активностью HCO₃⁻ АТФазы при инкубации в нормальных условиях. Во-вторых, Na⁺, возможно, обладают активирующим действием на HCO₃⁻ АТФазу, а удаление их из инкубационной среды приводит к снижению активности этой ферментной системы. Анализ полученных данных показал, что за счет снижения активности Na⁺,K⁺ АТФазы при замене Na⁺ на NH₄⁺ в инкубационной среде, активность HCO₃⁻ АТФазы может снижаться не более, чем на 22,6%. Однако, как видно из приведенных данных, такая замена ионов приводит к уменьшению активности на 42,7%. Следовательно, это снижение связано также с устранением эффекта активирующего влияния Na⁺ на HCO₃⁻ АТФазу.

Таким образом, под влиянием Na⁺ активность HCO₃⁻ АТФазы увеличивается, в среднем, на 1,5 мкмоль Р_н/мг белка/ч, что составляет прирост на 35%, по сравнению с величиной ее активности в безнатриевом растворе.

Таблица 1

Изменение активности (мкмоль Р_н/мг белка/ч) HCO₃⁻ и Mg⁺⁺ АТФаз в гомогенате клеток эпителия желчного пузыря кролика при замене Na⁺ на NH₄⁺ в инкубационной среде

АТФаза	n	АТФазная активность	Δ	p
HCO ₃ ⁻	4	7,5	-3,2±0,9	<0,001
Mg ⁺⁺	4	27,0	+1,7±1,1	<0,5

Δ—среднеарифметическая разность и стандартная ошибка между активностью АТФаз при инкубации гомогената в среде с 20 ммоль NaHCO₃ и 20 ммоль NH₄HCO₃; n—число опытов.

Таблица 2

Влияние оуабаина и этакриновой кислоты на активность (мкмоль Р_н/мг белка/ч) HCO₃⁻ АТФазы в гомогенате клеток эпителия желчного пузыря кролика

Ингибитор	n	Контроль	Δ	p
Оуабаин (моль)				
1·10 ⁻⁴	6	6,9	-0,5±0,64	>0,5
1·10 ⁻³	6	6,9	+0,2±1,81	>0,5
1·10 ⁻²	5	6,9	-1,2±0,76	<0,1
Этакриновая кислота (моль)				
1·10 ⁻⁴	5	9,3	-0,9±0,35	<0,2
3·10 ⁻⁴	4	9,4	-1,0±0,57	<0,2
5·10 ⁻⁴	5	8,2	-3,1±0,63	<0,001
1·10 ⁻³	9	8,3	-3,3±0,45	<0,001
2·10 ⁻³	6	7,9	-3,8±0,78	<0,001

Наличие некоторой активности Na^+, K^+ АТФазы может быть обусловлено привнесением незначительного количества K^+ с клеточным гомогенатом в среду определения активности HCO_3^- АТФазы. Поэтому, при расчете окончательной величины HCO_3^- АТФазы следует произвести коррекцию на значение активности Na^+, K^+ АТФазы в этой среде или угнетать ее добавлением в инкубационную среду оуабайна в дозе $1 \cdot 10^{-4}$ моль.

Таблица 3

Влияние оуабайна и этакриновой кислоты на активность (мкмоль $\text{P}_i/\text{мг}$ белка/ч) Mg^{++} АТФазы в гомогенате клеток эпителия желчного пузыря кролика

Ингибитор	n	Контроль	Δ	p
Оуабайн (моль)				
$1 \cdot 10^{-4}$	6	18,5	$-0,3 \pm 0,70$	$>0,5$
$1 \cdot 10^{-3}$	6	18,5	$-0,6 \pm 0,81$	$>0,5$
$1 \cdot 10^{-2}$	5	18,5	$-3,3 \pm 2,74$	$<0,5$
Этакриновая кислота (моль)				
$1 \cdot 10^{-4}$	5	22,2	$+1,3 \pm 0,94$	$<0,2$
$3 \cdot 10^{-4}$	4	20,6	$+0,4 \pm 0,57$	$<0,5$
$5 \cdot 10^{-4}$	5	17,2	$+2,3 \pm 0,34$	$<0,001$
$1 \cdot 10^{-3}$	9	19,0	$+2,0 \pm 0,5$	$<0,001$
$2 \cdot 10^{-3}$	6	19,6	$+2,6 \pm 1,0$	$<0,001$

Анализ кинетических кривых, показывающих зависимость между обратными величинами активности HCO_3^- АТФазы и концентраций АТФ в инкубационной среде, позволяет предположить, что в присутствии Na^+ , очевидно, уменьшается сродство фермента к субстрату. Молекулярный механизм этого явления требует, несомненно, специального изучения.

Опыты с применением ингибиторов показали, что HCO_3^- АТФаза не изменяет своей активности под влиянием оуабайна, но достаточно чувствительна к этакриновой кислоте, которая является блокатером транспорта изотонической жидкости через эпителиальный барьер [12, 22].

Существует предположение, что в эпителиальных клетках имеется этакринчувствительный насос, который не является Na^+, K^+ АТФазой [12]. Это допущение основано на том, что скорость транспорта изотонической жидкости угнетается меньшей дозой этакриновой кислоты, чем активность Na^+, K^+ АТФазы. Так, этакриновая кислота в дозе $3 \cdot 10^{-4}$ моль тормозит скорость переноса изотонической жидкости из полости пузыря кролика на 50% [12], а для достижения такого же уровня торможения активности Na^+, K^+ АТФазы концентрация этакриновой кислоты должна быть увеличена до $5 \cdot 10^{-3}$ моль [20]. Как видно из полученных нами данных, этакриновая кислота вызывает снижение активности HCO_3^- АТФазы на 50% уже в дозе $2 \cdot 10^{-3}$ моль. Это свидетельствует о более высокой чувствительности HCO_3^- АТФазы к этакриновой кислоте, по сравнению с Na^+, K^+ АТФазой. Однако, этакриновую кислоту нельзя считать, по-видимому, специфическим ингибитором HCO_3^- АТФазы, каковым, например, является оуабайн для Na^+, K^+ АТФазы, поскольку этакриновая кислота не вызывает полного торможения активности HCO_3^- АТФазы.

Таким образом, в результате, что в клетках эпителия ж стимулируемая, Mg^{++} зависим ингибируется этакриновой кис.

Л

1. Иващенко А. Г., Жубанова А. А. Вопросы мед. химии, 1976, 22, № 2
2. Иващенко А. Г., Рыскулова С. 1 эритроцитов крысы.— Вопросы м
3. Иващенко А. Г., Жубанова А. А., гомогенатов тканей крысы.— Био
4. Яременко М. С., Харламова О. Н транспорт изотонической жидко биол. и мед., 1974, 78, № 11, с. 10
5. Blum A. L., Shah G., Pierre T. S. Effect of HCO_3^- .— Biochem. and
6. Fanestil D. D., Hastings A. B., M tochondrial Adenosine Triphosph 843.
7. Fiske C. H., Subbarow Y. The Chem., 1925, 66, p. 375—400.
8. Iritani N., Wells W. W. Studies i rase system in rat liver lysosom
9. Izutsu K. T., Siegel I. A. Microso dibular gland.— Biochem. and bi
10. Kasbekar D. K., Durbin R. P. A sa.— Biochem. and biophys. acta,
11. Kinne-Saffran E., Kinne R. Pres border microvillus membranes (Med., 1974, 146, p. 751—753.
12. Leyssac P. P., Frederiksen O. Ar Secretory mechanisms of exocrine gaard, Copenhagen, 1974, p. 432—
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J. Phenol reagent.— J. Biol. Chem.,
14. Narumi S., Kanno M. Effects of of HCO_3^- -stimulated, Mg^{++} -dep mucosa.— Biochem. and biophys.
15. Sachs G., Shah G., Strych A., C III. Distribution of HCO_3^- -stimu phys. acta, 1972, 266, N 3, p. 625—
16. Sachs G., Mitch W. E., Hirshoe Exp. Biol. and Med., 1965, 119, N
17. Simon B., Kinne R., Knauf U. Tl dibularis of rabbit.— Pflügers Ar
18. Simon B., Kinne R., Sachs G. sue.— Biochem. and biophys. act
19. Simon B., Thomas L. HCO_3^- -s ties and its arrangement with 1972, 288, p. 434—442.
20. van Os C. H., Slegers J. F. G. (gall—bladder epithelium.— Pflü
21. Wheeler H. O. Transport of elec Amer. J. Physiol., 1963, 205, p. 4
22. Whittembury G., Proverbio F. kidney cortex slices.— Pflügers
23. Witzmann V., Christian A. L., 1 enzymes in the acini and du S. 39—47.

Отдел физиологии водно-солевого
Института физиологии им. А. А. 1
АН УССР, Киев

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в клетках эпителия желчного пузыря кролика имеется HCO₃⁻-стимулируемая, Mg⁺⁺ зависимая АТФаза, которая активируется Na⁺, ингибируется этакриновой кислотой и не чувствительна к оубаину.

Литература

1. Иващенко А. Г., Жубанова А. А. HCO₃⁻-стимулируемая АТФаза почек крысы.— Вопросы мед. химии, 1976, 22, № 2, с. 258—260.
2. Иващенко А. Г., Рыскулова С. Г. Стимулируемая бикарбонатом АТФаза мембран эритроцитов крысы.— Вопросы мед. химии, 1975, 21, № 5, с. 492—494.
3. Иващенко А. Г., Жубанова А. А., Балмуханов Б. С. HCO₃⁻-стимулируемая АТФаза гомогенатов тканей крысы.— Биохимия, 1975, 40, № 5, с. 1091—1093.
4. Яременко М. С., Харламова О. Н. О механизме тормозящего действия окситоцина на транспорт изотонической жидкости эпителием желчного пузыря.— Биол. эксперим. биол. и мед., 1974, 78, № 11, с. 10—11.
5. Blum A. L., Shah G., Pierre T. S. Properties of soluble ATPase of gastric mucosa. II. Effect of HCO₃⁻.— Biochem. and biophys. acta, 1971, 249, N 1, p. 101—113.
6. Fanestil D. D., Hastings A. B., Mahowald T. A. Environmental CO₂ stimulation of mitochondrial Adenosine Triphosphatase Activity.— J. Biol. Chem., 1963, 238, p. 836—843.
7. Fiske C. H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus.— J. Biol. Chem., 1925, 66, p. 375—400.
8. Iritani N., Wells W. W. Studies on a HCO₃⁻-stimulated ATPase and carbonic anhydrase system in rat liver lysosomes.— Arch. Biochem., 1974, 164, p. 357—366.
9. Izutsu K. T., Siegel I. A. Microsomal HCO₃⁻-stimulated ATPase from the dog submandibular gland.— Biochem. and biophys. acta, 1972, 284, p. 478—484.
10. Kasbekar D. K., Durbin R. P. An Adenosine Triphosphatase from frog gastric mucosa.— Biochem. and biophys. acta, 1965, 105, N 3, p. 472—482.
11. Kinne-Saffran E., Kinne R. Presence of bicarbonate stimulated ATPase in the brush border microvillus membranes of the proximal tubule.— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1974, 146, p. 751—753.
12. Leyssac P. P., Frederiksen O. An alternative model for isotonic water transport.— In: Secretory mechanisms of exocrine glands. Ed. by N. A. Thorn, O. H. Petersen, Munksgaard, Copenhagen, 1974, p. 432—448.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. e. a. Protein measurement with the Folin Phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, p. 265—275.
14. Narumi S., Kanno M. Effects of gastric acid stimulants and inhibitors on the activities of HCO₃⁻-stimulated, Mg⁺⁺-dependent ATPase and carbonic anhydrase in rat gastric mucosa.— Biochem. and biophys. acta, 1973, 311, p. 80—89.
15. Sachs G., Shah G., Strych A., Cline G. e. a. Properties of ATPase of gastric mucosa. III. Distribution of HCO₃⁻-stimulated ATPase in gastric mucosa.— Biochem. and biophys. acta, 1972, 266, N 3, p. 625—638.
16. Sachs G., Mitch W. E., Hirshowitz B. I. Frog gastric mucosal ATPase.— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1965, 119, N 4, 1023—1027.
17. Simon B., Kinne R., Knauf U. The presence of a HCO₃⁻-ATPase in glandula submandibularis of rabbit.— Pflügers Arch., 1972, 337, p. 177—184.
18. Simon B., Kinne R., Sachs G. The presence of a HCO₃⁻-ATPase in pancreatic tissue.— Biochem. and biophys. acta, 1972, 282, p. 293—300.
19. Simon B., Thomas L. HCO₃⁻-stimulated ATPase from mammalian pancreas. Properties and its arrangement with other enzyme activities.— Biochem. and biophys. acta, 1972, 288, p. 434—442.
20. van Os C. H., Slegers J. F. G. Characteristics of Na⁺, K⁺-stimulated ATPase in rabbit gall-bladder epithelium.— Pflügers Arch., 1970, 319, s. 49—56.
21. Wheeler H. O. Transport of electrolytes and water across wall of rabbit gall bladder.— Amer. J. Physiol., 1963, 205, p. 427—438.
22. Whittembury G., Proverbio F. Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices.— Pflügers Arch., 1970, 316, s. 1—25.
23. Witzemann V., Christian A. L., Wiechmann J. e. a. The distribution of membrane bound enzymes in the acini and ducts of the cat pancreas.— Pflügers Arch., 1974, 347, S. 39—47.

Отдел физиологии водно-солевого обмена
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
1.VII 1977 г.

M. S. Jaremenko, O. N. Kharlamova

 HCO_3^- ATPase OF RABBIT GALLBLADDER EPITHELIUM CELLS

Summary

In homogenate of rabbit gallbladder epithelium cells HCO_3^- stimulated, Mg^{++} dependent ATPase is found, the activity of which is on the average $7.5 \mu\text{mol}$ of P_i/mg of protein/h with incubation of homogenate in the potassium-free medium containing 20 mmol of NaHCO_3 and 2 mmol of MgCl_2 . In the same medium the homogenate preserves an inconsiderable activity of Na^+ , K^+ ATPase ($1.7 \mu\text{mol}$ of P_i/mg of protein/h), that may be due to penetration of small amounts of K^+ with cell homogenate into the medium. With incubation of cell homogenate in the medium optimal for Na^+ , K^+ ATPase the activity of this enzymic system is $10.8 \mu\text{mol}$ of P_i/mg of protein/h. In experiments when Na^+ is replaced by NH_4^+ the activation effect of Na^+ on HCO_3^- ATPase in the incubation medium was found. Ouabain in the concentrations of 1.10^{-4} , 1.10^{-3} and 1.10^{-2} mol has no effect on the activity of this enzymic system. Ethacrinic acid in the concentrations of 5.10^{-4} — 2.10^{-3} mol inhibits the activity of HCO_3^- ATPase, a degree of inhibition growing with the substance dose.

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

УДК 612.460

Е. И. Го

О ЗНАЧЕНИИ АЛЬФА-А
В РЕГУЛЯЦИИ Е
И МОЧЕОБРАЗОВ

В многочисленных исследованиях воспроизводимое прессорное влияние (НА) на сосуды почек [5, 21], угнетение почечной функции при симпатической блокаде [14, 18].

Предпринимались попытки объяснить сегментарное сопротивление сосудов о преимущественном их влиянии имеются сведения о преобладающей либо о равнозначном увеличении выходящих артериол [15]. Приводятся данные (0,05 мг/кг) вызывают преимущественно артериол, тогда как при введении в кровотоку в сосудах почки и афферентных артериол, сопровождаемого током, гломерулярного давления, работы почек подчеркивается прямая зависимость от почечной фильтрации и изменения скорости кровотока, что говорит о возможности влияния почечного эпителия. При этом, одна из особенностей изменений концентрации антидиуретического гормона с сопутствующим изменением скорости кровотока, обусловленным прямым влиянием катехоламинов на ток задней доли гипофиза [9].

Указанные обстоятельства вопроса об удельном значении почечного кровотока, излияния и отводящих сосудов клубочков, определяющих в конечной функции почки при α -адрен

Методи

Опыты проведены на 49 собак (всего).

Через боковой разрез забрюшинной и мочеточник. Системное артериальное давление в бедренной артерии. Кровоток в почке с помощью датчика электромагнитного расхода крови производился на черной.

Из катетера, введенного в мочеточник, отбирались пробы мочи в течение каждого 10 мин периода. Клубочковая функция определялась методом очищения по эн