

УДК 612.67.014.3/423:611.36—018.1

В. В. Фролькис, Л. Н. Богацкая, С. Н. Новикова

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕПАТОЦИТОВ ПОСЛЕ КРОВОПОТЕРИ

Изучение метаболических механизмов изменения функции клеток является одной из основных задач современной физиологии. Комплексом работ нашего коллектива была показана связь между активностью генетического аппарата клетки и электрическими свойствами мембраны [13, 14, 22]. Оказалось, что активация генетического аппарата, биосинтеза белка, достигаемая различными факторами (гормоны, регенерация, гиперфункция), сопровождается гиперполяризацией. Отмечена временная связь между повышением мембранного потенциала и усилением синтеза ряда фракций РНК. Ингибиторы биосинтеза белка (актиномицин Д, пуромидин, циклогексимид, ионизирующее облучение) снижают активацию генетического аппарата в этих условиях и предупреждают развитие гиперполяризации. Важно и то, что активация генетического аппарата вызывает активный транспорт ионов натрия и калия между клеткой и внеклеточной средой.

Удачной моделью для изучения связи между активностью генетического аппарата и электрическими свойствами мембраны клетки является реакция клеток печени на кровопотерю. При кровопотере существенно снижается содержание белков в сыворотке крови, и в ответ на это компенсаторно усиливается белоксинтезирующая функция печени. Так, было показано, что после кровопотери у животных разных видов усиливается в печени синтез т-РНК, р-РНК, увеличивается содержание ДНК, количество синтезированных белков, в каналах эндоплазматического ретикулума появляется мелкозернистый фибриллярный материал, активируется деление клеток [7, 9, 12, 15].

В настоящей работе сделана попытка установить связь между изменением мембранного потенциала клеток и сдвигами в системе биосинтеза белка печеночных клеток.

Мы изучали влияние кровопотери на величину мембранного потенциала клеток печени, содержание белка и белковых фракций сыворотки крови, обновление РНК и белка в печени, обмен адениннуклеотидов и креатинфосфата, на внутри- и внеклеточное содержание ионов натрия и калия. Для анализа некоторых метаболических механизмов изменения мембранного потенциала эти взаимоотношения исследовали также после введения актиномицина Д, который, как известно, блокирует ДНК-зависимый синтез РНК.

Методика исследований

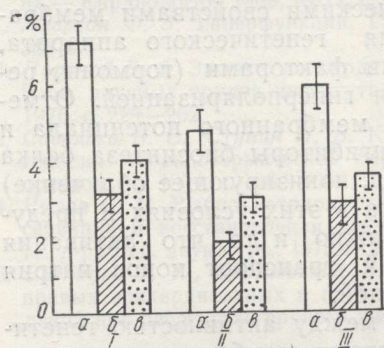
Опыты проведены на 150 белых крысах в возрасте 8—10 мес. Кровопотеря достигалась однократным выпуском крови из хвостовой вены крыс и составляла 2% от веса животного. Мембранный потенциал клеток печени определяли методом внутриклеточного введения стеклянными микроэлектродами по [3]. Концентрацию суммарных белков сыворотки крови определяли по модифицированному микрометоду [2], концентрацию сывороточных белковых фракций — методом электрофореза по

[1], интенсивность обновления суммарных белков печени — по включению ^{14}C -гидролизата белка хлореллы в ткань печени ($25 \text{ мкКи}/100 \text{ г}$) [5]. Интенсивность обновления РНК определяли по включению ^{14}C -аденина в РНК гепатоцитов ($30 \text{ мкКи}/100 \text{ г}$) [8]. Определение адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) в печени проводили методом низковольтного электрофореза на бумаге по [26]. Содержание креатинфосфата (КФ) — по количеству фосфора, который отщепляется в кислой среде при комнатной температуре в течение 30 мин из безбелкового экстракта, полученного путем обработки трихлоруксусной кислотой навески печени, замороженной в жидком азоте. Содержание неорганического фосфора определяли колориметрическим способом по [20]; содержание ионов калия и натрия (K^+ и Na^+) — методом пламенной фотометрии на фотометре типа ФЛП-1 [10]. Внеклеточные и внутриклеточные концентрации электролитов рассчитывали по формуле [20].

Результаты исследований

Кровопотеря приводила к увеличению мембранного потенциала гепатоцитов, к развитию гиперполяризации. Возникшая гиперполяризация была стойкой и поддерживалась в течение нескольких суток. Так,

если исходная величина МП гепатоцитов составляет $38,6 \pm 1,2 \text{ мВ}$, через 6 ч после кровопотери она достигает $42,8 \pm 1,3 \text{ мВ}$, через 24 ч $54,7 \pm 0,9 \text{ мВ}$, через 48 ч — $52,3 \pm 0,8 \text{ мВ}$, через 96 ч — $46,8 \pm 1,4 \text{ мВ}$. Это увеличение МП клеток пе-



Влияние кровопотери на содержание общего белка и белковых фракций в сыворотке крови белых крыс.

а — общий белок, б — альбумины, в — глобулины. I — исходный уровень, II — 6 ч после кровопотери, III — 24 ч после кровопотери.

чени сопровождалось активацией биосинтеза белка. Как видно из рисунка, через 6 ч после кровопотери существенно уменьшается содержание общего белка и белковых фракций сыворотки крови, а через 24 ч содержание их практически восстанавливается. Об активации генетического аппарата, биосинтеза белка в печени свидетельствует рост удельной активности РНК (с 928 ± 80 до $1730 \pm 105 \text{ имп/мин/мг РНК}$) через 24 ч после кровопотери и белка (с 1262 ± 65 до $1728 \pm 83 \text{ имп/мин/мг белка}$) через 24 ч после кровопотери.

Одновременно с ростом МП, активацией биосинтеза белка возникают существенные сдвиги в энергетическом обмене. Как видно из табл. 1, через 6 ч после кровопотери достоверно падает содержание АТФ, АДФ, КФ, растет содержание АМФ и Фн. Особенно значительное падение уровня АТФ — на 50% ниже исходного уровня. Через 24 ч после кровопотери содержание АДФ и, в особенности, КФ остается значительно ниже исходного, — на 28,2 и 27% соответственно. Определенное суммарное представление о напряженности энергетических процессов в клетке дают потенциал фосфорилирования Клингенберга [24] и коэффициент Аткинсона [18], который характеризует энергетический заряд системы АТФ-АДФ-АМФ и рассчитывается по формуле:

$$\frac{1}{2} \cdot \frac{(\text{АДФ}) + 2(\text{АТФ})}{(\text{АМФ}) + (\text{АДФ}) + (\text{АТФ})} \cdot \frac{[\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}]} \cdot \frac{[\text{Фн}]}{[\text{АТФ}]}$$

Потенциал фосфорилирования в какой-то мере может служить показателем энергоснабжения и энерготрат [11]. Их величины для печени взрослых животных составляют $9,97 \pm 0,31$, через 6 ч после кровопотери — $19,12 \pm 1,10$, через 24 ч — $12,7 \pm 0,73$ для коэффициента Клингенберга и 0,6, 0,43 и 0,42, соответственно, для коэффициента Аткинсона.

Сод

Иссле
показ

АТФ

АДФ

АМФ

КФ

Фн

p* — до

Измене
сопровожд
вопоти на
внутриклет
концентрац
 K^+/Na^+ с 4

Таблица 1

Содержание АТФ, АДФ, АМФ (мкмоль/г), КФ, Фн (мг %) в печени 8—10-месячных крыс после кровопотери

Исследуемые показатели	Статистические показатели	Исходный уровень	После кровопускания	
			6 ч	24 ч
АТФ	<i>n</i>	11	10	14
	<i>M</i>	1,38	0,68	1,29
	$\pm m$	0,03	0,02	0,06
			<i>p</i> *	
АДФ	<i>M</i>	0,65	0,46	0,55
	$\pm m$	0,02	0,03	0,04
			<i>p</i> *	<i>p</i> *
АМФ	<i>M</i>	0,75	0,89	0,87
	$\pm m$	0,01	0,025	0,04
			<i>p</i> *	<i>p</i> *
КФ	<i>M</i>	8,22	6,01	5,80
	$\pm m$	0,18	0,19	0,22
			<i>p</i> *	<i>p</i> *
Фн	<i>M</i>	21,5	28,3	27,5
	$\pm m$	1,3	2,2	1,03
			<i>p</i> *	<i>p</i> *

*p** — достоверность относительно исходного уровня.

Таблица 2

Содержание K^+ и Na^+ (мэкв/л) крыс после кровопотери

Исследуемые показатели	Статистические показатели	Исходный уровень	После кровопускания
Калий вне-клеточный	<i>M</i>	2,0	2,86
	$\pm m$	0,1	0,18
			<i>p</i> *
Калий внут-риклеточный	<i>M</i>	267,5	283,04
	$\pm m$	2,4	1,09
			<i>p</i> *
Натрий вне-клеточный	<i>M</i>	50,1	34,6
	$\pm m$	4,8	1,2
			<i>p</i> *
Натрий внут-риклеточный	<i>M</i>	48,1	42,3
	$\pm m$	2,6	1,02
			<i>p</i> *

*p** — достоверно относительно исходного уровня.

Изменения в величине мембранного потенциала после кровопотери сопровождаются ионными сдвигами. Как видно из табл. 2, после кровопотери нарастает внутриклеточная концентрация K^+ и уменьшается внутриклеточное содержание Na^+ . Перераспределение внутриклеточной концентрации K^+ и Na^+ обуславливает увеличение коэффициента K^+/Na^+ с $4,8 \pm 0,3$ (исходный уровень) до $6,9 \pm 0,4$ (после кровопуска-

ния). Подобное перераспределение ионов является результатом их активного транспорта, направленного против градиента концентраций.

Для анализа связи между сдвигами в уровне МП печеночных клеток и биосинтезом белка в них, был использован антибиотик актиномицин Д, который образует комплекс с ДНК *in vivo* и *in vitro*. Актиномицин Д блокирует образование всех фракций клеточной РНК в клетках прокариотов и эукариотов, хотя при низких концентрациях сильнее подавляется синтез рибосомальной РНК. Актиномицин Д в наших опытах вводили в дозе 50 мкг/100 г сразу после кровопускания. Актиномицин Д сам по себе существенно не изменяет величины МП клеток печени. Однако на фоне действия актиномицина Д кровопотеря не приводила к росту исходной величины МП. Через 24 ч после кровопотери МП печеночных клеток не отличается от исходной величины ($40,5 \pm 1,6$ мВ). Актиномицин Д, как видно из табл. 3, предупреждает

Таблица 3

Влияние актиномицина Д на обновляемость суммарной РНК (имп/мин/мг РНК) и содержание АТФ, АДФ, АМФ, (мкмоль/г), КФ (мг%) в печени 8—10-месячных крыс после кровопотери

Исследуемые показатели	Статистические показатели	Исходный уровень	Кровопотеря	Кровопотеря+актиномицин Д
имп/мин мг/РНК	<i>n</i>	12	11	12
	<i>M</i>	928	1730	930
	$\pm m$	80	105	78
		p_1	p^*	p_1
АТФ	<i>n</i>	12	12	10
	<i>M</i>	1,40	0,82	1,42
	$\pm m$	0,09	0,01	0,15
		p_1	p^*	p_1
АДФ	<i>M</i>	0,61	0,40	0,63
	$\pm m$	0,06	0,05	0,05
		p_1	p^*	p_1
АМФ	<i>M</i>	0,74	1,21	0,70
	$\pm m$	0,08	0,03	0,04
		p_1	p^*	p_1
КФ	<i>M</i>	8,6	4,6	8,3
	$\pm m$	0,81	0,23	0,21
		p_1	p^*	p_1

p^* — достоверность относительно исходного уровня, p_1 — достоверность относительно кровопускания.

прирост обновления РНК после кровопотери и влияет на обмен адениннуклеотидов. На фоне актиномицина Д кровопотеря не приводит к столь выраженным сдвигам в содержании адениннуклеотидов, креатинфосфата. Так, если сама по себе кровопотеря снижает содержание АТФ, АДФ, КФ, то на фоне действия актиномицина Д после кровопускания не обнаружено достоверных изменений, по сравнению с исходным уровнем, в содержании адениннуклеотидов. В этих условиях не наступают сдвиги в величине коэффициентов Клингенберга и Аткинсона.

Получе
связи межд
гиперполяри
вызывает ус
щее к восст
но с увелич
личина мем
процессы не
другом по м
результаты
щегося клас
реакции. Ок
теря не выз
витие гипер
ке при акти
содержания
следовательно
содержания
венно влияю
По нашим д
энергетическ
чению коэфф
сона. Умень
связано с у
ресинтеза. С
эффективност
лиза [16]. К
фосфорилиро
[АДФ]
нием [АТ
синтез АТФ
кровопускани
ции энергии
Обращает на
к примеру, в
нокислот с с
одновременн
образованием
[6], повыше
активировать
Сдвиги
в значительн
тивным тран
одной пептид
две высокоэ
каждой пепт
самой РНК
мнению ряда
ное количеств
Эти наш
серии опытов
Фн исследов
актиномицин

Обсуждение результатов исследований

Полученный фактический материал подтверждает положение о связи между активностью генетического аппарата клеток и развитием гиперполяризации клеточной мембраны. Действительно, кровопотеря вызывает усиление белоксинтезирующей функции гепатоцитов, ведущее к восстановлению количества сывороточных белков. Одновременно с увеличением интенсивности обновления РНК и белка растет величина мембранного потенциала гепатоцитов. Мы полагаем, что это процессы не просто одновременно протекающие, а связанные друг с другом по механизму своего осуществления. Об этом свидетельствуют результаты серии опытов с использованием актиномицина Д, являющегося классическим ингибитором ДНК-зависимой РНК-полимеразной реакции. Оказалось, что на фоне действия этого ингибитора кровопотеря не вызывает активации биосинтеза белка и предупреждает развитие гиперполяризации. Весь комплекс сдвигов, наступающих в клетке при активации генетического аппарата, сопровождается ростом содержания внутриклеточного калия и снижением натрия и имеет, следовательно, активный механизм. Следует напомнить, что изменения содержания внутриклеточного калия и натрия сами по себе существенно влияют на интенсивность биосинтеза белка в клетке [17, 25]. По нашим данным, кровопотеря приводит к существенным сдвигам в энергетическом обмене — падению количества АТФ, АДФ, КФ, увеличению коэффициента Клингенберга и уменьшению коэффициента Аткинсона. Уменьшение содержания АТФ после кровопускания может быть связано с усилением использования АТФ, либо с торможением ее ресинтеза. Снижение кровотока в печени приводит к усилению менее эффективного пути энергообразования, к усилению анаэробного гликолиза [16]. Клингенберг [24] показал, что скорость сопряженного с фосфорилированием окисления в митохондриях регулируется отношением $\frac{[АДФ]}{[АТФ]}$ $\frac{[Фн]}{[Фн]}$. При увеличении этого соотношения повышается синтез АТФ в митохондриях. По нашим данным, величина его после кровопускания увеличивается на 91%. О напряжении системы генерации энергии свидетельствует и снижение коэффициента Аткинсона. Обращает на себя внимание и рост содержания АМФ. Напомним, что, к примеру, важная стадия биосинтеза белка, а именно, активация аминокислот с образованием аминок-ацил-тРНК, протекает с отщеплением одновременно двух концевых фосфатных групп в виде пирогосфата с образованием АМФ. Следует подчеркнуть, что по мнению Меерсона [6], повышение коэффициента фосфорилирования само по себе может активировать биосинтез белка в клетке.

Сдвиги в энергетических процессах в клетке после кровопотери в значительной степени связаны с усилением биосинтеза белка и активным транспортом ионов. Следует учитывать, что при образовании одной пептидной молекулы аминок-ацил-тРНК в реакции используются две высокоэнергетические фосфатные связи. Кроме того, образование каждой пептидной связи требует 21,9 ккал [4]. Наконец, метаболизм самой РНК в клетке требует для своего протекания АТФ [17]. По мнению ряда авторов, на активный транспорт ионов падает значительное количество энергетического пула клетки [21, 23].

Эти наши обобщения подтверждаются результатами специальной серии опытов, в которой обмен адениннуклеотидов, содержание КФ, Фн исследовали на фоне блокады генетического аппарата клетки актиномицином Д. Оказалось, что блокада как бы «предохраняет»

адениннуклеотиды, КФ от значительных изменений после кровопотери. После введения актиномицина Д не возникали достоверные изменения в содержании адениннуклеотидов по сравнению с исходным уровнем.

Можно полагать, что в связи с возникновением при введении актиномицина Д блокады биосинтеза белка резко сокращаются энергетические траты на обеспечение этого процесса, что ведет к сохранению содержания адениннуклеотидов и креатинфосфата в клетке. Кроме того, блокада биосинтеза белка предупреждает развитие гиперполяризации и ограничивает энергетические траты, идущие на транспорт ионов.

Таким образом, активация генетического аппарата, усиление биосинтеза белка при кровопотере определяет сдвиги в уровне МП, в энергетическом обмене клеток печени. Активация биосинтеза белка ведет к гиперполяризации и усилению энергетического обмена, блокада генетического аппарата предупреждает эти сдвиги.

Литература

1. Гурвич А. Е. Электрофорез сыворотки на бумаге.— В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1964, с. 110—123.
2. Кирк Л. Количественный ультрамикрoанализ.— М., 1950.— 315 с.
3. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника.— Киев, 1960.— 128 с.
4. Ленинджер А. Молекулярные основы структуры и функции клетки.— М.: Мир, 1974.— 957 с.
5. Литошенко А. Я. Биосинтез митохондриальных белков при старении. Геронтология и гериатрия. Ежегодник. Генетические механизмы старения и долголетия. 1977, с. 86—90.
6. Меерсон Ф. З. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность.— М., 1975.— 262 с.
7. Мосевич Г. Н., Костовцева Н. В., Кривошенко Г. Н. Морфофункциональные изменения клеток печени кролика при кровопотере.— Цитология, 1974, 16, № 10, с. 1222—1227.
8. Мурадян Х. К. Синтез фракций РНК печени крыс разного возраста. «Геронтология и гериатрия». 1977. Ежегодник. Генетические механизмы старения и долголетия, 1977, с. 66—70.
9. Полищук С. М., Силакова А. И., Ларичева Н. И. Вплив гострої крововтрати на вміст нуклеїнових кислот у печінці та її субклітинних фракціях.— Укр. біохім. ж., 1972, 44, № 5, с. 583—588.
10. Саночинська О. Б., Шуба Е. П. Визначення натрію, калію та кальцію методом полум'яної фотометрії в тканинах.— Укр. біохім. ж., 1965, № 1, с. 151—154.
11. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке.— М.: Наука, 1969.— 440 с.
12. Тыртышников И. М. Влияние острой массивной кровопотери в условиях лечения кислородом под повышенным давлением на обмен нуклеиновых кислот в печени белых крыс.— Бюл. эксп. биол. и мед., 1974, № 6, с. 23—25.
13. Фролькис В. В., Мартыненко О. А., Коротоножкин В. Г. Влияние ингибиторов биосинтеза белка на развитие гиперполяризации одиночных мышечных волокон.— Биофизика. 1972, 17, № 5, с. 839—843.
14. Фролькис В. В. Старение и биологические возможности организма. М.: Наука, 1975.— 270 с.
15. Шавлов А. Д., Моршанова Е. Ф., Каменина Т. Г. Изменение синтеза РНК и энзиматической активности изолированных ядер костного мозга кроликов после кровопускания.— В кн.: Регуляторные и компенсаторные механизмы организма при некоторых патологических процессах. Оренбург, 1974, с. 68—70.
16. Шепотиновский В. И., Гармютенко З. И. О специфичности изменений обмена гликогена в печени и крови при травматическом шоке и острой кровопотере.— Эксперимент. хирургия и анестезиол., 1975, № 1, с. 73—76.
17. Alfrey V. G. Aspects of protein biosynthesis.— N. Y.— Lond: Acad. Press., 1970, p. 247—252.
18. Atkinson D. E. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers.— Biochem., 1968, N 7, p. 4030—4034.
19. Benson K. S., Frier B. E., Nolhoway B. E., Marbene G. Distribution of fluid and electrolyte concentration of actomycin and other proteins in myocardium of dogs with chronic conyzozine heart failure.— Amer. J. Physiol., 1956, 187, p. 463—492.
20. Fiske C., Subbarow G. Nature of «inorganic phosphate» in voluntary muscle.— Science, 1927, 65, p. 401—406.

21. Framasier H. efflux in s 366.
22. Frolkis V. V. 29, N 12, p. 1
23. Hodgkin A. L. and laige.— J
24. (Klingenberg тохондриях, СССР, М., с.
25. Levine H., T transfer react
26. Stransky L. I graphy, 1963,

Институт герон
АМН СССР, К

V.
CH

In experime
were compared wi
(2% of the body
background of en
of ATP, ADP, CI
decrease of intrac
of hyperpolarizati
adenine nucleotide
related to the acti

Institute of Geron
Scienc

21. Framasier H. S., Keynes R. D. The effect of metabolic inhibitors on the sodium efflux in sodium loaded frog sartorius muscle.— J. Physiol., 1959, 148, N 2, p. 362—366.
22. Frolkis V. V. Protein biosynthesis and hyperpolarisation of cells.— Experientia, 1973, 29, N 12, p. 1492—1494.
23. Hodgkin A. L., Keynes H. D. Activity transport of cations in giant axon from sepioid and laige.— J. Physiol., 1955, 29, N 2, p. 128—132.
24. (Klingenberg M.), Клингберг М. Окислительно-восстановительные реакции в митохондриях, зависящие от АТФ. 1962, труды V МБК, Симпозиум V, Изд-во АН СССР, М., с. 55—59.)
25. Levine H., Trindle M., Moldave K. Monovalent cation requirement for the aminoacyl transfer reaction in protein synthesis.— Nature, 1966, 211, p. 5055.
26. Stransky L. Determination of adenine nucleotides by paper electrophoresis Chromatography, 1963, p. 4—9.

Институт геронтологии
АНН СССР, Киев

Поступила в редакцию
19. IV 1979 г.

V. V. Frolkis, L. N. Bogatskaya, S. N. Novikova

CHANGES IN HEPATOCYTE MEMBRANE POTENTIAL FOLLOWING HEMORRHAGE

Summary

In experiments with albino rats the shifts in hepatocyte membrane potential value were compared with changes in protein biosynthesis and energy generation. The hemorrhage (2% of the body weight) induced marked hyperpolarization of hepatocytes against the background of enhanced protein biosynthesis and increased energy expenditures (decrease of ATP, ADP, CP). This was accompanied by the accumulation of intracellular K^+ and decrease of intracellular Na^+ . Actinomycin D prevents the hemorrhage-induced development of hyperpolarization, activation of RNA and protein biosynthesis and enhancement of adenine nucleotide metabolism. The hepatocyte hyperpolarization following hemorrhage is related to the activation of the cell genetic apparatus.

Institute of Gerontology, Academy of Medical
Sciences, USSR, Kiev