

ВЛИЯНИЕ АНТИМЕМБРАННОЙ ГЕПАТОЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ НА ЖЕЛЧЕОТДЕЛЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТФазы В МЕМБРАНАХ ГЕПАТОЦИТОВ

Процессы, происходящие в плазматической мембране гепатоцита, играют важную роль в осуществлении его желчеобразовательной функции. По современным представлениям, каналикулярную желчь условно разделяют на две фракции: 1) зависимую от желчных кислот и 2) независимую от желчных кислот. Считается, что образование первой фракции желчи обусловлено осмотическим эффектом желчных кислот, секретируемых в каналикулярное пространство. Образование же независимой от желчных кислот фракции желчи связывают с транспортом Na^+ из гепатоцита в желчные капилляры, осуществляемым с помощью мембранного фермента Na^+ , K^+ -АТФазы [5, 9, 10].

Показано, что образование двух фракций желчи в значительной степени взаимообусловлено, поскольку желчные кислоты могут активировать Na^+ , K^+ -АТФазу [6], облегчая таким образом перенос ионов Na , а Na^+ , K^+ -АТФаза обеспечивает энергией процессы, связанные с транспортом желчных кислот [8].

При нарушении структуры мембраны меняется активность мембранных ферментов. Установлено [16], что повреждение мембран аккумулярованными внутри печеночной клетки или в пространстве желчного протока желчными кислотами при перевязке желчного протока приводит к уменьшению активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Изучение изменений мембран, приводящих к нарушению функций гепатоцита, возможно с помощью антител. Модель поражения гепатоцита специфическими антителами удачно воспроизводит реальные аутоиммунные процессы, которые могут возникать при патологии печени.

В наших ранее проведенных исследованиях с применением больших доз антигепатоцитотоксической сыворотки, полученной по отношению ко всем антигенам печени, было обнаружено нарушение желчеотделительной функции печени, которое проявилось в снижении уровня желчетока, уменьшении концентрации и содержания желчных кислот в желчи [1]. Установлено, что через 3 сут после пятикратного ежедневного введения больших доз гамма-глобулиновой фракции антигепатоцитотоксической сыворотки активность АТФазы мембран гепатоцитов уменьшается [2]. Были получены данные в пользу того, что снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранах и уменьшение желчеотделения в эти сроки связаны с ослаблением белоксинтетических процессов в печени [2].

Представляется важным исследовать непосредственное воздействие антител на функцию мембран гепатоцитов в ранние сроки, когда специфический эффект влияния антител на мембраны не связан еще с общим поражением гепатоцита.

Целью настоящего исследования было создание модели иммунной патологии мембран гепатоцитов с помощью антимембранной гепатоцитотоксической сыворотки (АМГЦС) и изучение при этом изменений скорости желчетока и активности Na^+ , K^+ -АТФазы в плазматических мембранах гепатоцитов.

Методика. Опыты проведены на 102 крысах-самцах линии Вистар. АМГЦС получали иммунизацией кроликов плазматическими мембранами гепатоцитов, плазматические мембраны — по [11] с некоторыми модификациями. У декапитированных под легким эфирным наркозом крыс печень промывали пропусканием под давлением через нижнюю полую вену охлажденной 0,25 М сахарозы. Печень от трех—пяти крыс гомогенизировали в 0,25 М сахарозе с 1 ммоль ЭДТА и 10 ммоль трис HCl (pH 7,4). Отфильтрованный гомогенат центрифугировали 20 мин при 7000 g; супернатант — 60 мин при 100 000 g, ресуспендированный осадок — 120 мин при 110 000 g в бакет-роторе центрифуги VAC-601 в дискретном сахарозном градиенте плотности, образованном растворами сахарозы с плотностями 1,20; 1,16 и 1,08 г/см³. Хорошо выраженные слои частиц между слоями

сахарозы с плотностями 1,20—1,16 (тяжелая субфракция) и 1,16—1,08 (легкая субфракция) отсасывали и промывали бидистиллированной водой 60 мин при 100 000 g. Иммунизацию кроликов осуществляли суммарной мембранной фракцией. Титр полученной иммунной сыворотки определяли в реакции связывания комплемента [7]. Из АМГПС выделяли γ -глобулиновую фракцию — γ -АМГПС, которую в дозе 10 мг белка на 100 г веса крысы вводили наркотизированным нембуталом крысам в воротную вену печени. Контрольным крысам в таком же объеме вводили физиологический раствор.

Для изучения желчеотделения наркотизированным крысам в желчный проток вставляли полиэтиленовую канюлю и фиксировали количество желчи, выделившееся через 5, 10, 20, 60 мин после введения γ -АМГПС. Скорость желчетока выражали в количестве (мл) желчи, выделившейся за 1 мин.

Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли в двух фракциях плазматических мембран гепатоцитов: легкой, выделенной на границе плотностей 1,16—1,08, и тяжелой, выделенной на границе плотностей 1,20—1,16. По литературным данным [15], легкая фракция содержит преимущественно каналикулярные мембраны, а тяжелая — синусоидальные и латеральные. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли по количеству P_i , выделяемого в результате расщепления АТФ при участии этого фермента. В инкубационную среду, содержащую в конечных концентрациях (ммоль) 2 Mg Cl_2 , 100 NaCl , 20 KCl , 2 АТФ, 50 трис HCl , pH 7,8 добавляли полученные фракции плазматических мембран по 100—300 μ белка в пробу. Через 20 мин реакцию останавливали 10 % ТХУ. Белок осаждали, P_i в надосадочной жидкости определяли по [14]. Контролем служили пробы с ингибитором Na^+ , K^+ -АТФазы строфантином К (10^{-4} моль). Количество белка определяли по [12].

Для проверки чистоты выделенных фракций мембран в них определяли активность маркерного для мембран фермента 5'-нуклеотидазы по [12], а также маркерного для эндоплазматического ретикула фермента глюкозо-6-фосфатазы по [3]. Чистоту выделенных фракций контролировали также электронномикроскопически. * Полученные данные обработаны статистически [4].

Результаты и их обсуждение. Определение активности маркерных ферментов плазматических мембран — Na^+ , K^+ -АТФазы и 5'-нуклеотидазы, а также фермента-маркера эндоплазматического ретикула глюкозо-6-фосфатазы позволило оценить степень чистоты полученных фракций. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы во фракции, выделенной между плотностями 1,20—1,08, была в 7,7 раза больше, чем в исходном гомогенате. Легкая и тяжелая субфракции обладали различной активностью этого фермента: легкая — 4,4 мкмоль, P_i на 1 мг белка за час, тяжелая — 1,32 (активность Na^+ , K^+ -АТФазы гомогената 0,37 мкмоль P_i на 1 мг белка за час). Наше заключение о большей активности Na^+ , K^+ -АТФазы в легкой фракции согласовывается с литературными данными [15], где был сделан вывод об обогащенности легкой фракции каналикулярными, а тяжелой — синусоидальными и латеральными мембранами.

Активность другого маркерного для плазматических мембран фермента — 5'-нуклеотидазы — в легкой фракции была в 18,1 раза, а в тяжелой — в 13,4 раза больше, чем в гомогенате.

Активность глюкозо-6-фосфатазы в суммарной фракции мембран составляла 2,14, а в гомогенате — 2,04 мкмоль P_i на 1 мг белка за час. Это свидетельствует о незначительном загрязнении выделенных плазматических мембран эндоплазматическим ретикулом.

Электронномикроскопические исследования показали, что легкая фракция плазматических мембран содержит более мелкие везикулы, а тяжелая — более крупные везикулы и элементы шероховатого эндоплазматического ретикула (рис. 1).

* Электронномикроскопический анализ выделенных нами фракций был проведен в отделе гематологии и цитохимии Киевского института эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР.

Серологическая характеристика АМГПС в перекрестных реакциях с ядрами и митохондриями гепатоцитов

Сыворотка, № серии	Антиген	Титр в РСК
1	Мембранная фракция	1 : 320
	Митохондрии	1 : 10
	Ядра	0
2	Мембранная фракция	1 : 200
	Митохондрии	1 : 10
	Ядра	0

Таким образом, проведенный ферментативный и электронномикроскопический анализ антигенного материала позволил сделать вывод, что иммунизация кроликов при получении АМГЦС осуществлялась суспензией мембранных везикул с небольшой примесью эндоплазматического ретикулула.

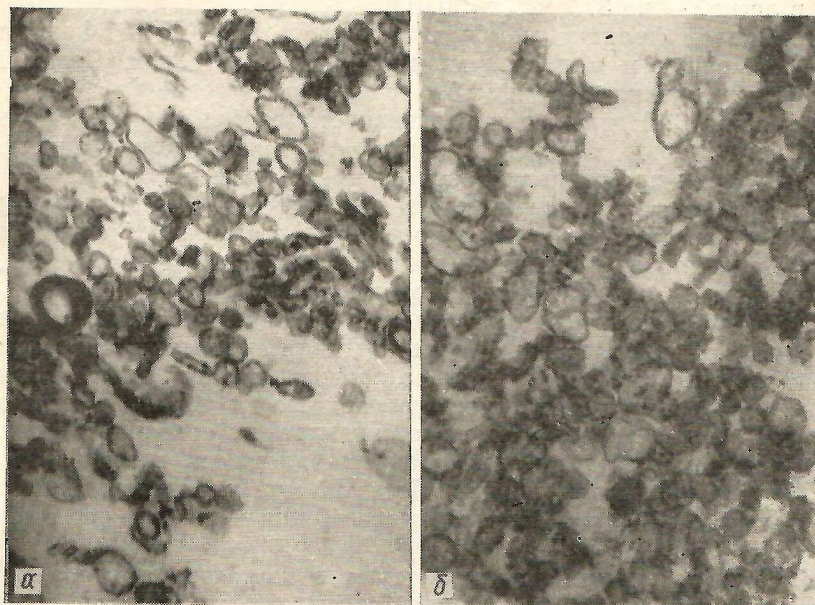


Рис. 1. Плазматические мембраны гепатоцитов. Электроннограммы. Ув. 63 000.

а — мембраны, выделенные в градиенте плотности сахарозы 1,16—1,08 (легкая фракция); б — 1,20—1,16 (тяжелая фракция).

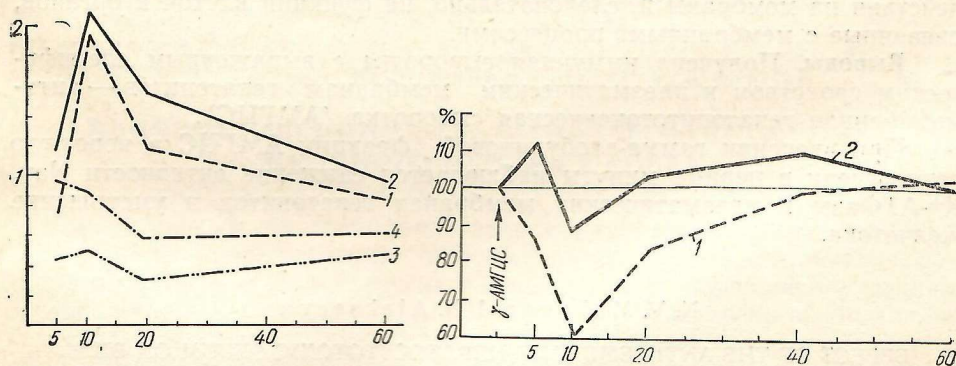


Рис. 2. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в легкой (1, 2) и тяжелой (3, 4) фракциях плазматических мембран гепатоцитов при введении γ -АМГЦС (1, 3) и физиологического раствора (2, 4).

По вертикали — активность Na^+ , K^+ -АТФазы, в $\mu\text{моль } \text{P}_i$ на 1 мг белка за час. По горизонтали — время (мин).

Рис. 3. Изменение скорости желчетока (мл/мин) у крыс после введения γ -АМГЦС в воротную вену печени.

По вертикали — скорость желчетока в % к исходному уровню (до введения γ -АМГЦС). По горизонтали — время в мин. 1 — введение γ -АМГЦС; 2 — введение физиологического раствора.

Изучение серологической характеристики АМГЦС в реакции связывания комплемента с различным антигенным материалом печеночной клетки показало наличие в ней значительного количества антител к плазматическим мембранам гепатоцитов, незначительное (в 20—32 раза меньше) количество антител к митохондриям и полное отсутствие антител к ядрам (см. таблицу).

Данные об изменении активности Na^+ , K^+ -АТФазы в плазматических мембранах гепатоцитов под влиянием γ -АМГЦС представлены на рис. 2. Через 5 мин после введения γ -АМГЦС в воротную вену печени наблюдалось резко выраженное падение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранах. В тяжелой фракции снижение было более выраженным — на 45,8 % ($p < 0,01$) от контроля (введения физиологического раствора); в легкой — на 37,7 % ($p < 0,01$).

В тяжелой фракции мембран активность Na^+ , K^+ -АТФазы оставалась сниженной и в последующие сроки наблюдений. Через 10 и 20 мин она составляла 61,7 и 50,8 % уровня в контроле ($p < 0,05$ в том и другом случае). Нормализация активности фермента в этой фракции наблюдалась лишь к 60 мин. В легкой фракции мембран активность Na^+ , K^+ -АТФазы восстанавливалась быстрее — уже к 10 мин.

Таким образом, под влиянием введения γ -АМГЦС в воротную вену печени более глубокие изменения происходят в тяжелой фракции плазматических мембран, обогащенных, по литературным данным [14], синусоидальными и латеральными мембранами гепатоцитов.

Применение γ -АМГЦС вызвало также снижение скорости желчетока (рис. 3). В первые 5 мин после введения сыворотки это снижение было статистически достоверным по сравнению с данными, полученными при введении физиологического раствора ($p < 0,05$) и составляло 22,9 %. К 10 мин скорость желчетока снизилась по сравнению с контролем на 31,4 %. В последующие сроки наблюдалось постепенное восстановление скорости желчетока. Через 20 мин у опытных животных она составила 81,8 % от контроля, через 40 мин — 91,1 %, через 60 мин 102,1 %.

Полученные данные свидетельствуют о том, что антитела к мембранным антигенам гепатоцитов при связывании с этими антигенами существенно нарушают функции мембран. Они снижают активность мембранного фермента Na^+ , K^+ -АТФазы и, как следствие, уменьшают желчеток. Таким образом, антитела, содержащиеся в антимембранных сыворотках, можно использовать в качестве активного средства воздействия на мембраны и, следовательно, на функции клеток и органов, связанные с мембранными процессами.

Выводы. Получена иммунная сыворотка с выраженным специфическим сродством к плазматическим мембранам гепатоцитов — антимембранная гепатотоксическая сыворотка (АМГЦС).

При введении гамма-глобулиновой фракции АМГЦС в воротную вену печени в первые минуты наблюдается снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы в плазматических мембранах гепатоцитов и уменьшение желчетока.

N. V. Makogon, I. N. Alekseeva

EFFECT OF THE ANTIMEMBRANE HEPATOCYTOTOXIC SERUM ON BILE SECRETION AND ACTIVITY OF Na^+ , K^+ -ATPase IN HEPATOCYTIC MEMBRANES

Antimembrane hepatocytotoxic serum (AMHCS) was obtained by means of immunization of rabbits with purified plasmatic membranes of rat hepatocytes. Administration of γ -globulin AMHCS fraction in a dose of 10 mg per 100 g of the body mass to the portal vein of the rat liver results in a decrease of Na^+ , K^+ -ATPase activity in plasmatic membranes of hepatocytes, primarily in their heavy fraction enriched with sinusoidal and lateral membranes. This decrease is most expressed in early terms of the study: 5, 10, 20 min, when the bile secretion rate also decreases.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Список литературы

1. Алексеева И. Н. Противопеченочные антитела и функции печени. — Киев: Наук. думка, 1980. — 182 с.
2. Алексеева И. Н. Роль синтеза белка в изменении желчетока под влиянием противопеченочных антител. — Физиол. журн., 1980, 28, № 4, с. 417—421.