

Список литературы

1. Антипов А. Б., Маркин С. А., Тверитинов Д. И. и др. Использование расчетных методов определения осмолярности крови.— *Анестезиология и реаниматология*, 1978, № 4, с. 81—85.
2. Баринов Э. Ф., Кац М. Г., Портных А. Я. Оценка различных режимов вентиляции при перфузии изолированных легких.— Там же, 1982, № 2, с. 44—47.
3. Брюханов В. М. Функция изолированной перфузируемой почки.— В кн.: Регуляция функции почек и водно-солевого обмена. Барнаул, 1973, вып. 3, с. 55—71.
4. Колпаков М. Г. Кортикостероидная регуляция водно-солевого гомеостаза.— Новосибирск: Наука, 1967.—259 с.
5. Крепс Е. М., Ченыхаева Е. Ю. Новые данные по обмену CO_2 у ракообразных и насекомых.— *Изв. АН СССР*, 1942, 5, с. 310—320.
6. Тодоров И. Клинические и лабораторные исследования в педиатрии.— София: Медицина и физкультура, 1963.—874 с.
7. Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов.— М.: Медицина, 1975.—252 с.
8. Шюк О. Функциональное исследование почек.— Прага: Гос. мед. изд-во, 1981.—333 с.
9. Steele T. H., Challoner-Hue L., Gottstein J. H. et al. Acid-base maneuvers and phosphate transport in the isolated rat kidney.— *Pflügers Arch.*, 1981, 392, N2, p. 178—182.
10. Szenasi G., Bencsath P., Lehoczky E. et al. Tubular transport and urinary excretion of phosphate after renal denervation in the anesthetized rat.— *Amer. J. Physiol.*, 1981, 240, N6, F481—F486.
11. Tannen R. L. Relationship of renal ammonia production and potassium homeostasis.— *Kidney Int.*, 1977, 11, N6, p. 453—465.
12. Török B., Böth A., Toth J. et al. Selbst-perfundierendes Herz-Lungen-Nieren-Preparat. II. Mikroskopische Beobachtungen an perfundierten Organen.— *Acta Chir. Hung.*, 1974, 15, N1, p. 5—10.
13. Welbourne T. C., Francoeur D. Influence of aldosterone on renal ammonia production.— *Amer. J. Physiol.*, 1977, 233, N1, E56—E60.

Донец. мед. ин-т

Поступила 29.08.83

УДК 612.0141

Е. Н. Панасюк, А. Г. Мысаковец, М. Ф. Тимочко

РОЛЬ ИНТЕНСИВНОСТИ И СОПРЯЖЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОДДЕРЖАНИИ ЭЛЕКТРОЛИТНОГО ГОМЕОСТАЗИСА

В соответствии с современными представлениями, поддержание гомеостаза живой клетки определяется мощностью и интенсивностью процессов катаболизма, поддерживающих ее энергетический потенциал, и процессов анаболизма, восстанавливающих деструктивные изменения функционирующих субклеточных структур за счет эффективного использования энергии обменных процессов в пластическом обмене. Согласно литературным данным [3, 4, 5, 8, 21, 22], системы метаболических превращений в клетке сопряжены с обменом электролитов. В настоящее время не возникает сомнений, что поддержание трансмембранного градиента ионов энергозависимо и связано с синтетическими процессами. Однако аналитический подход к выявлению корреляционных связей обмена электролитов с отдельными сторонами клеточного метаболизма еще не дает полного представления о механизме регуляции и сопряженности этих процессов. Особенно слабо исследована роль энергетического обмена в определении сопряженности процессов катаболизма и анаболизма и поддержании электролитного гомеостаза.

Поэтому целью нашей работы было изучить особенности поддержания электролитного баланса в системах с различным уровнем энергетического обмена и роль в этом процессе интенсивности и сопряженности окислительно-восстановительных реакций.

Методика. Исследования проводили на изолированных гепатоцитах интактных животных. Суспензию клеток получали по [18] с использованием соевого ингибитора трипсина (3 мг/мл, 10 мин). Гепатоциты в концентрации $4 \cdot 10^7$ в 1 мл инкубировали при 37°C в среде, содержащей NaCl — 140, KCl — 5,2, NaHCO_3 — 4,1, глюкозу — 5,5, трис — 15 ммоль, pH — 7,4. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли по [10], внутриклеточное содержание АТФ и АДФ по [20], K^+ и Na^+ по [6] до и через 15 и 30 мин после гиперкалиевой нагрузки (увеличение концентрации KCl в среде инкубации гепатоцитов до 10 ммоль). Кроме того, на протяжении всего периода инкубации с помощью ионселективных электродов определяли концентрацию K^+ и Na^+ во внеклеточной среде. ОВП измеряли в динамике, в милливольтх. Перед началом опыта при регистрации ОВП платиновые электроды тщательно обрабатывали [16, 17], а затем проверяли в окислительно-восстановительной системе, составленной из растворов красной (Fe^{+3}) и желтой (Fe^{+2}), кровяной соли различной концентрации [19]. Для воспроизведения высокоактивного функционального состояния к суспензиям клеток добавляли АДФ. При добавлении в среду выделения ЭДТА (10^{-3} моль) и к суспензии клеток сывороточного альбумина (2 мг/мл) для связывания активаторов окислительных процессов — двухвалентных ионов и свободных жирных кислот, получали клетки в низколабильном функциональном состоянии. Для реконструкции АТФазной активности использовали водную суспензию фосфолипидов [11].

Полученные данные подвергали статистическому анализу [13].

Результаты. Из табл. 1 видно, что клетки с предварительным добавлением АДФ обладают более высоким трансмембранным градиентом ионов ОВП и активностью Na^+ , K^+ -АТФазы, по сравнению с гепатоцитами, преинкубированными с сывороточным альбумином. Увеличение концентрации K^+ в среде инкубации клеток, преинкубированных с АДФ, приводит к повышению ионного градиента, содержания АТФ, позитивации ОВП и активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Направленность энер-

Таблица 1. Изменение ОВП (мВ), содержания АТФ, АДФ, K^+ , Na^+ (ммоль/ $1 \cdot 10^6$ кл), активности Na^+ , K^+ -АТФазы (мкг $\text{P}_n/1 \text{ ч} \cdot 1 \cdot 10^6$ кл) и активности неседиментируемой щелочной и кислой фосфатаз (ммоль р-нитрофенола/1 ч·мл) при гиперкалиевой нагрузке гепатоцитов, преинкубированных с АДФ ($M \pm m$)

Исследуемые показатели	Контроль	Время после нагрузки	
		15 мин	30 мин
АТФ	$5,9 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,2$ >0,05	$7,6 \pm 0,2$ <0,05
АДФ	$2,3 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,01$ <0,01	$3,6 \pm 0,01$ <0,01
АТФаза	$4,2 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,03$ <0,01	$9,3 \pm 0,02$ <0,01
K^+	$83,0 \pm 0,2$	$80,0 \pm 0,5$ <0,05	$99,0 \pm 0,8$ <0,05
Na^+	$45 \pm 1,1$	$40,0 \pm 0,8$ >0,05	$37,0 \pm 1,8$ <0,05
Кислая фосфатаза	$5,2 \pm 0,09$	$4,5 \pm 0,08$ >0,05	$4,3 \pm 0,1$ >0,05
Щелочная фосфатаза	$22,6 \pm 0,3$	$21,5 \pm 0,2$ >0,05	$23,1 \pm 0,2$ >0,05
ОВП	$-40,0 \pm 3,5$	$32,0 \pm 2,0$ <0,05	$38,0 \pm 2,2$ <0,01

гетического обмена клеток, преинкубированных с сывороточным альбумином, имеет другой характер (табл. 2). К 15 мин гиперкалиевой нагрузки этих клеток отмечается активация Na^+ , K^+ -АТФазы с последующим уменьшением ее активности ниже исходного уровня к 30 мин. В этих же условиях наблюдали прогрессирующее уменьшение ОВП, содержания АТФ и концентрации внутриклеточного K^+ .

Анализ представленных данных показывает, что более высокий градиент ионов в гепатоцитах, предварительно инкубированных с АДФ, по всей вероятности, связан с преобладанием функциональной активности мембран и интенсивности окислительно-восстановительных процессов. Такое предположение согласуется с результатами предыдущих наших исследований [14, 15, 16], а также с литературными данными о том [7], что активация энергетического обмена стабилизирует липопротеидные структуры мембран и увеличивает резистентность клеток.

Таблица 2. Изменение ОВП (мВ), содержания АТФ, АДФ, K^+ , Na^+ (ммоль/1 · 10⁶ кл), активности Na^+ , K^+ -АТФазы (мкг Р_н/1 ч · 10⁶ кл) и активности неседиментируемой щелочной и кислой фосфатаз (ммоль р-нитрофенола/1 ч · мл) при гиперкалиевой нагрузке гепатоцитов, преинкубированных с сывороточным альбумином ($M \pm m$)

Исследуемые показатели	Контроль	Время после нагрузки	
		15 мин	30 мин
АТФ	8,0 ± 0,2	3,9 ± 0,1 <0,01	1,5 ± 0,2 <0,01
АДФ	2,0 ± 0,01	1,6 ± 0,02 >0,05	2,5 ± 0,02 >0,05
АТФазы	2,3 ± 0,03	8,5 ± 0,1 <0,001	1,2 ± 0,02 <0,01
K^+	69,0 ± 0,8	20,0 ± 1,7 <0,001	15,0 ± 1,2 <0,01
Na^+	55,0 ± 0,9	93,0 ± 1,5 <0,01	115,0 ± 2,2 <0,001
Кислая фосфатаза	7,1 ± 0,07	11,2 ± 0,1 <0,05	13,0 ± 0,15 <0,01
Щелочная фосфатаза	37,2 ± 0,21	45,0 ± 0,35 <0,05	52,1 ± 0,23 <0,01
ОВП	-80,0 ± 2,5	-115,0 ± 2,3 <0,05	-120,0 ± 3,0 <0,05

На значение окислительно-восстановительных процессов и функциональной активности мембран в поддержании трансмембранного градиента ионов указывает и выявленное нами значительное увеличение градиента ионов, в клетках, преинкубированных с АДФ, при повышении в инкубационной среде концентрации K^+ , который, согласно литературным данным [1], является наиболее адекватным клеточным раздражителем. Поддержание высокого уровня макроэргических фосфатов в этих же условиях, на фоне прогрессирующе возрастающей активности Na^+ , K^+ -АТФазы — факт, на первый взгляд, противоречивый, но вполне объяснимый, если учесть, что в данной ситуации возможно увеличение оборотности реакции $АДФ \rightleftharpoons АТФ$ за счет интенсификации окислительного фосфорилирования и увеличения молекулярной активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Отмечалась возможность интенсификации процессов фосфорилирования в представленных условиях и увеличения молекулярной активности Na^+ , K^+ -АТФазы [2, 9]. Об этом же свидетельствует и позитивация ОВП (табл. 1), обусловленная изменением потенциала системы, вследствие фиксации высвобождающейся энергии в энергию макроэргических соединений, используемых для поддержания функциональной активности клеточных и субклеточных структур. В представленной метаболической ситуации немаловажную роль, возможно, играют и синтетические процессы, определяющие индукцию синтеза ферментного белка, стабилизацию мембран, что создает условия для функциональной цикличности фермента. О значении активности Na^+ , K^+ -АТФазы в этих процессах свидетельствует и отсутствие существенных изменений в содержании белкового компонента данного фермента, рассчитанного нами на сухой остаток гепатоцитов, при увеличении удельной активности АТФазы [12].

Более низкий по сравнению с клетками, активированными АДФ, исходный ионный градиент в клетках при инкубации их с сывороточным альбумином, где окислительно-восстановительные процессы, судя по увеличению отрицательности ОВП и уменьшению скорости потребления кислорода [15], менее активны, указывает на значение интенсивности энергетического обмена в поддержании активности Na^+ , K^+ -АТФазы. При низкой активности окислительно-восстановительных процессов в клетках, преинкубированных с сывороточным альбумином, гиперкалиевая нагрузка вызывает энергетический дефицит [16], что обуславливает преобладание процессов катаболизма с последующими деструктивными изменениями клеточных мембран. Подтверждением этого является увеличение активности неседиментированной щелочной и кислой фосфатаз (табл. 3), определяемых в данных условиях опыта [16].

Таблица 3. Влияние 2,4-ДНФ, цианида калия, азид натрия на содержание K^+ и Na^+ (ммоль/1 · 10⁶ кл) и изменение активности неседиментируемой щелочной и кислой фосфатаз (ммоль р-нитрофенола/1 ч · мл) в клетках, преинкубированных с АДФ

Исследуемые показатели	Контроль	ДНФ	Цианид К	Азид Na
K^+	83,0±0,2	20,0±1,5 <0,01	14,0±1,2 <0,01	18,0±1,8 <0,01
Na^+	45,0±1,1	110,0±2,0 <0,01	117,0±2,3 <0,001	115,0±2,1 <0,001
Кислая фосфатаза	5,8±0,1	11,3±0,15 <0,001	14,1±10 <0,001	
Щелочная фосфатаза	22,1±0,2	34,5±0,25 <0,001	48,3±0,3 <0,001	

Двухфазное изменение активности Na^+ , K^+ -АТФазы: первоначальная активация (15 мин) и последующее ее угнетение (30 мин) может быть обусловлено обеднением фосфолипидного микроокружения данного фермента. О роли липидного микроокружения в поддержании активности Na^+ , K^+ -АТФазы свидетельствует отсутствие угнетения ее активности на 30 мин инкубации при добавлении в инкубационную среду водной суспензии фосфолипидов. Однако развитие более глубоких деструктивных изменений приводит к необратимому уменьшению активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Таким образом, результаты исследований, представленные в данной работе, предыдущие наши исследования, а также литературные данные свидетельствуют о том, что функциональная нагрузка, обеспечивающая в высокоактивном функциональном состоянии гепатоцитов активацию энергетического обмена с последующей стабилизацией мембран, компенсацией и поддержанием трансмембранного градиента ионов, в условиях низколабильного состояния клеточных структур обуславливает нарушение сопряженности катаболических и анаболических реакций, что приводит к деструкции ферментов цикла Кребса и дыхательной цепи, истощению макроэргического фонда, повреждению мембранных структур клетки и уравниванию внутри- и внеклеточной концентрации ионов.

Подтверждением роли интенсивности и сопряженности окислительно-восстановительных процессов в поддержании электролитного гомеостаза является увеличение активности неседиментированной как щелочной, так и кислой фосфатаз и потеря трансмембранного градиента ионов в гепатоцитах, преинкубированных с АДФ, при воздействии на них таких разобщающих и ингибирующих энергетический обмен факторов (табл. 3), как динитрофенол (2 ммоль), цианид натрия (5 ммоль), азид натрия (1 ммоль), а также результаты наших предыдущих исследований [12, 16], указывающих на то, что активация энергетического

обмена сопровождается интенсификацией катаболизма липопротеидных структур клеточных мембран с компенсацией и суперкомпенсацией структурно-метаболических изменений в энергизованных клетках и прогрессирующими деструктивными изменениями с низким энергетическим обменом.

Выводы. Клетки, преинкубированные с АДФ, обладают более высоким трансмембранным градиентом ионов, ОВП и активностью Na^+ , K^+ -АТФазы по сравнению с клетками, преинкубированными с сывороточным альбумином. Гиперкалиевая нагрузка клеток, преинкубированных с АДФ, приводит к повышению ионного градиента, содержания АДФ, позитивации ОВП, активации Na^+ , K^+ -АТФазы и стабилизации липопротеидных структур.

Компенсация трансмембранного градиента ионов клеток в высокоактивном функциональном состоянии обеспечивается увеличением молекулярной активности Na^+ , K^+ -АТФазы и стабилизацией мембран за счет активации энергетического обмена.

Гиперкалиевая нагрузка клеток в низколабильном состоянии сопровождается прогрессирующим уменьшением содержания белково-липидных компонентов электролитно-транспортных ферментов, потерей трансмембранного градиента электролитов и деструктивными изменениями клеток.

E. N. Panasyuk, A. G. Mysakovets, M. F. Timochko

THE ROLE OF REDOX PROCESS INTENSITY AND CONJUGATION IN MAINTENANCE OF ELECTROLYTE HOMEOSTASIS

The role of redox process intensity and conjugation in the maintenance of electrolyte homeostasis is studied in model investigations of isolated hepatocytes in highly active and low-labile functional states.

It is established that compensation and maintenance of transmembrane K^+/Na^+ gradient of isolated rat hepatocytes in the highly active functional state after hyperpotassium loading is supported by the membrane stabilization, intensification and conjugation of redox processes as well as by the increase in the number of K, Na-ATPase turn-overs.

Hyperpotassium loading of cells in low-labile functional state is accompanied by developing destructive changes in cells and by loss of transmembrane K^+ and Na^+ electrolyte gradient on the account of noneffective utilization of substrate-energy resources and separation of oxidation and reduction processes.

Medical Institute, Lvov

Список литературы

1. Барз Л. А. О чувствительности рецепторов тонкого кишечника к ионам калия. — Докл. АН СССР, 1961, 140, № 5, с. 1213—1216.
2. Болдырев А. А., Козлова И. О., Смирнова И. Н., Швец В. И. Регуляция активности Na^+ , K^+ -АТФазы одновалентными катионами. — Биохимия, 1977, 42, вып. 8, с. 1466—1469.
3. Горизонтов П. Д. Гомеостаз. — М.: Медицина, 1981. — 234 с.
4. Долгов В. В., Райскина М. Е., Антонов Р. Ф. Действие адреналина на содержание калия в митохондриях сердца собаки и зависимость транспорта K^+ от дыхания и окислительного фосфорилирования. — Биофизика, 1974, вып. 6, с. 1025—1033.
5. Есипенко Б. Е. Механизм обмена одновалентных ионов в железисто-эпителиальной ткани печени. — В кн.: Тез. докл. XIV съезда всесоюз. физиол. о-ва им. И. П. Павлова. Баку, 1983, т. 1, с. 314—315.
6. Колб В. Т., Комишников В. С. Определение электролитов методом пламенной фотометрии. — В кн.: Клиническая биохимия. Минск, 1976, с. 33—36.
7. Козырева Е. В., Елисеенко Н. Н., Яшкин П. Н., Тихомирова М. В. АДФ как один из возможных регуляторов восстановительных процессов клетки и организма после облучения. — Радиобиология, 1977, 17, вып. 5, с. 733—737.
8. Костава В. Т., Шарышев А. А., Рахманинова А. Б. и др. Индукция ионного транспорта, сопряженная с окислительными реакциями в мембранах митохондрий и липосом. — Биофизика, 1979, 24, вып. 2, с. 230—233.
9. Ленинджер А. Л. Митохондрия, молекулярные основы структуры и функции. — М.: Мир, 1966. — 252 с.