

НАТРИЙТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ ГЕПАТОЦИТОВ
И ИХ РОЛЬ В ЖЕЛЧЕОТДЕЛИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ
ПЕЧЕНИ

В связи с зависимостью объемной скорости желчеотделения от экскреции с желчью ионов натрия [3] представляется важным изучение механизмов, обеспечивающих обмен натрия и воды в печени. В отличие от эпителиальных тканей почечных канальцев, мочевого и желчного пузырей, в железисто-эпителиальной ткани печени механизмы транспорта более сложны, а общепризнанного представления о натрийтранспортирующих системах в этой ткани до сих пор не сложилось.

Есть основание предположить, что наряду с Na^+ , K^+ -АТФазой клеточных мембран гепатоцитов [7, 12, 17] в процессах транспорта принимает участие HCO_3^- -АТФаза, обнаруженная в других отделах гепатобиллиарной системы [8, 11, 13, 15], хорошо изученная в кишечнике [1, 8] и почках [19] и играющая существенную роль в трансэпителиальном транспорте.

Эти данные побудили нас использовать для изучения механизмов транспорта натрия строфантин — специфический ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы и этакриновую кислоту, к которой проявляет высокую чувствительность HCO_3^- -АТФаза, с целью проследить характер взаимоотношений транспорта натрия и желчеотделения.

Методика

Исследования проводили на изолированной перфузируемой печени крыс, инкубируемых срезах печени и фракциях плазматических мембран гепатоцитов.

Изолированную печень перфузировали по описанному ранее методу [2]. Перфузат объемом 400 мл содержал раствор Кребса, полиглюкин и геоссен, взятые в равных соотношениях. В течение 1 ч печень перфузировали контрольным раствором, затем его заменяли раствором, содержащим этакриновую кислоту (10^{-5} ; 10^{-4} ; $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) или строфантин К ($2 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Концентрацию натрия и калия в перфузате и желчи определяли методом фотометрии пламени на фотометре (марка «Цейс-Иена», модель 3).

Инкубацию срезов печени проводили по методу van Rossum [18] в среде (рН $7,4 \pm 0,05$), включающей (в миллимоль на литр): NaCl — 125, NaHCO_3 — 15; NaH_2PO_4 — 1; KCl — 6; MgSO_4 — 1,2; глюкозу — 11. Концентрация вводимого строфантина К составляла 10^{-4} , а этакриновой кислоты — 10^{-5} моль/л.

Плазматические мембраны гепатоцитов получали методом дифференциального центрифугирования, среда выделения (рН 7,4) содержала сахарозу (0,25 моль/л), ЭДТА (1 ммоль/л) и трис- HCl (1 ммоль/л). Разведение гомогената составляло 1:7. Отмывание суспензии плазматических мембран производили раствором сахарозы, концентрация которого составляла 0,3 моль/л, при 105 тыс. g. Белок определяли методом Лоури [16].

Для определения активности транспортных АТФаз использовали среду (рН 7,45) следующего состава (в миллимоль на литр): NaCl — 125; KCl — 6; MgCl_2 — 1,2; NaHCO_3 — 20; CaCl_2 — 6. Для ингибирования Na^+ , K^+ -АТФазы в среду добавляли строфантин К (10^{-4} моль/л), а для ингибирования HCO_3^- -АТФазы добавляли этакриновую кислоту (10^{-3} и 10^{-4} моль/л) и удаляли ионы HCO_3^- . Образующийся при гидролизе АТФ фосфор неорганический определяли методом Fiske, Subborow (14).

Статистическая обработка проведена по методу Ойвина (9).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования особенностей обмена натрия в ткани печени [3], показали участие Na^+ , K^+ -АТФазы в транспорте натрия в гепатоцитах. Определение активности фермента в гомогенате ткани пе-

чени [6], суспензии плазматических мембран [7] и в субфракции плазматических мембран гепатоцитов [5] показало, что обнаруживается она как в синусоидальных, так и в каналикулярных участках мембран клеток печени, однако активность фермента в ткани печени не так высока, как в нервной и почечной тканях.

С целью исследования работы натриевого насоса в функционирующей полярной клетке определяли АТФазную активность в инкубируемых срезах печени при внесении в среду инкубации строфантина К (10^{-4} моль/л). Установлено, что гидролиз 1 моль АТФ срезами печени при действии специфического ингибитора активного транспорта натрия, осуществляемого Na^+ , K^+ -АТФазой, снижается на 19,8 % ($P < 0,001$), т. е. в данных условиях на работу Na^+ , K^+ -АТФазы затрачивается до 1/5 энергии АТФ. Добавление строфантина в инкубационную среду вызывало в клетках срезов печени повышение содержания натрия с 50,6 до 57,7 моль/кг, что составляло 14 % всего транспорта натрия. После введения строфантина ($2 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) в перфузат наблюдалось усиление экскреции натрия с желчью изолированной печенью (таблица).

Влияние строфантина ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и этакриновой кислоты (10^{-4} моль/л) на показатели обмена натрия и калия в изолированной печени и скорость желчеотделения

Показатель	Строфантин		Этакриновая кислота	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Скорость экскреции с желчью, $\text{мкмоль} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$				
Калия				
1	$4,1 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,3$
2	$4,0 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,2$	$9,5 \pm 1,4$
P	$> 0,5$	$< 0,002$	$> 0,5$	$< 0,05$
натрия				
1	$92,0 \pm 3,7$	$97,3 \pm 3,8$	$106,4 \pm 3,5$	$121,8 \pm 6,8$
2	$88,0 \pm 2,4$	$139,5 \pm 9,4$	$99,4 \pm 2,8$	$235,7 \pm 27,8$
P	$> 0,5$	$< 0,05$	$> 0,5$	$< 0,02$
Содержание К в ткани, ммоль/кг				
1	$91,87 \pm 1,73$	$83,85 \pm 1,35$	$102,45 \pm 2,54$	$102,48 \pm 1,94$
Скорость желчеотделения, $(\text{мкл/кг}) \cdot \text{мин}^{-1}$				
1	$628,9 \pm 9,3$	$623,5 \pm 19,3$	$682,3 \pm 44,2$	$814,0 \pm 50,0$
2	$611,0 \pm 18,7$	$872,2 \pm 41,5$	$652,4 \pm 41,5$	$1524,0 \pm 0,209$
P	$> 0,5$	$< 0,05$	$> 0,5$	$< 0,05$

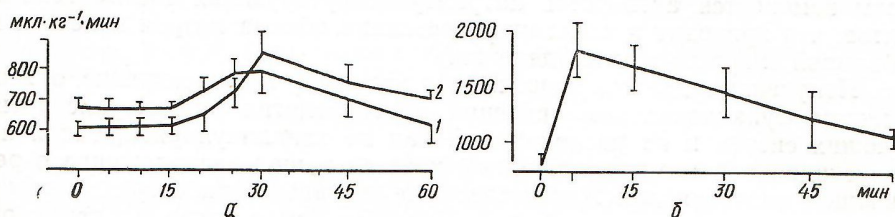
Примечание. 1 — значение показателя перед заменой перфузата, 2 — через 30 мин после замены.

Исходя из наших наблюдений и данных литературы о чувствительности HCO_3^- -АТФазы к этакриновой кислоте [8, 11, 13, 15], этот препарат (концентрация 10^{-4} моль/л) применяли в качестве ингибитора активного потока натрия. При этом наблюдали снижение скорости гидролиза АТФ срезами печени на 31,2 % и повышение содержания натрия в клетках печени с 41,9 до 67,0 ммоль/кг, что составляло 37,0 %. Добавление этакриновой кислоты в перфузат (10^{-4} моль/л) увеличивало экскрецию натрия с желчью (см. таблицу).

Таким образом, результат действия строфантина и этакриновой кислоты на обмен натрия на первый взгляд одинаков — накопление натрия в гепатоцитах за счет торможения активного потока ионов. Такое изменение транспорта натрия сказывается на функции в обоих случаях тоже одинаково — происходит стимуляция желчеотделения. Увеличение объемной скорости желчеотделения наблюдалось как под влиянием строфантина, так и этакриновой кислоты (см. таблицу, ри-

сунок). Причем наблюдаемый эффект зависел от концентрации используемых ингибиторов. Концентрация строфантина ниже 10^{-4} моль/л не вызывала никакого изменения желчеотделения, повышение концентрации приводило к усилению наблюдаемого эффекта (см. рисунок, позицию *a*).

Стимулирующее влияние этакриновой кислоты на секрецию желчи было более существенным (см. рисунок, позицию *б*). Так, при ее концентрации в перфузате, составляющей 10^{-4} моль/л скорость желчеотде-



Динамика объемной скорости желчеотделения при введении в перфузат ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФазы и HCO_3^- -АТФазы:

a — строфантин К (1 — $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, 2 — $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л); *б* — этакриновая кислота.

ления повышалась в 2 раза. Более высокие концентрации препарата ($2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) снижали или даже полностью тормозили скорость желчеотделения. Но в последнем случае, как показали данные морфологического контроля, существенно повреждалась структура клеток, нарушалась их целостность [4].

Экспериментальный анализ механизма действия строфантина и этакриновой кислоты показал, что наряду с наблюдаемыми общими закономерностями в действии строфантина и этакриновой кислоты существуют отличия в характере изменений обмена калия и воды, транспорт которых через плазматические мембраны связан с натрием.

Внутриклеточное содержание калия понижалось при инкубации срезов печени в среде со строфантином с 52,2 до 28,2 ммоль/кг. Этакриновая кислота, наоборот, даже несколько повышала его содержание в клетках (с 63,2 до 68,4 ммоль/кг).

Оба препарата при перфузии изолированной печени усиливали экскрецию калия с желчью (см. таблицу). Однако при введении в перфузат строфантина содержание калия в ткани печени снижалось (в моль на килограмм) с $91,87 \pm 1,73$ до $83,85 \pm 1,36$, а этакриновая кислота его не изменяла.

Ранее установлено [10], что при перфузии печени раствором, содержащим этакриновую кислоту (10^{-4} моль), существенно увеличиваются размеры гепатоцитов и уменьшаются просветы межклеточных промежутков. Это указывает на приток в клетки воды. При введении в перфузат строфантина размеры клеток не изменялись.

Эффект одновременного действия строфантина и этакриновой кислоты в икубируемых срезах печени на гидролиз АТФ составляет почти арифметическую сумму действия каждого ингибитора, примененного в отдельности.

Исходя из приведенных и имеющихся в литературе данных [13, 15], натрийтранспортирующие системы гепатоцитов, так же, как это отмечено и для других тканей [19], являются строфантин- и этакринчувствительными. Это разные ферментные системы, которые в работе, очевидно, проявляют значительную сопряженность. Можно предположить, что повышение экскреции натрия с желчью при перфузии изолированной печени под влиянием строфантина является результатом изменения функционального состояния транспортных систем как синусоидальной, так и каналикулярной мембраны. Строфантин ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазу синусоидальных мембран, с которыми он в первую очередь непосредственно контактирует. Повышение в результате этого внутриклеточного содержания натрия может в свою очередь стимули-

ровать активный транспорт натрия через каналикулярные мембраны гепатоцитов, что приводит к увеличению скорости желчеотделения.

Этакриновая кислота, по результатам наших исследований, блокирует в гепатоцитах транспорт натрия, независимый от калия, обеспечивающий активный транспорт натрия и пассивный поток воды. О существовании такого рода насосов свидетельствуют ранее проведенные исследования [8, 19].

Таким образом, под влиянием строфантина К и этакриновой кислоты изменяется активность натрийтранспортирующих систем гепатоцитов, что приводит к изменению состояния обмена натрия в печени и объемной скорости желчеотделения.

Полученные данные позволяют высказать предположение о возможном функциональном значении в гепатоцитах натрийтранспортирующих систем и их расположения как на каналикулярной, так и на синусоидальной мембране. Подтверждается наше предположение о решающем значении для желчеотделения активного транспорта натрия через каналикулярные мембраны. Вместе с тем в связи с огромной ролью печени на уровне целостного организма, не менее важна роль потока натрия и некоторых метаболитов через синусоидальную мембрану. Ионы натрия поступают в клетки путем простой диффузии, а также путем совместного транспорта с желчными кислотами, сахарами, аминокислотами и другими метаболитами. Активный транспорт натрия в кровяное русло, который можно рассматривать как часть метаболического потока, — это возможная функция натрийтранспортирующих систем синусоидальных мембран гепатоцитов. Сопряжение работы натрийтранспортирующих систем синусоидальных и каналикулярных мембран способствует осуществлению многочисленных функций печени.

B. E. Esipenko, L. I. Zhalilo, A. P. Kostromina, O. D. Sinelnik

NA-TRANSPORT SYSTEMS OF HEPATOCYTES AND THEIR ROLE IN BILE SECRETION OF THE LIVER

The Na⁺, K⁺ and HCO₃⁻-stimulated Na-transport systems of the hepatocytes were investigated in the experiments with the isolated, perfused liver, slices and membrane suspension of the liver tissue. A supposition is advanced on the functional role of Na-transport systems of the sinusoidal and canalicular membranes of hepatocytes.

Institute of Physiology of T. G. Shevchenko University,
Kyiv

1. Дувакин И. А., Шубин В. С. Свойства NaCl/NaHCO₃-активируемой АТФазы в слизистой оболочке тонкого кишечника // Актуальные вопросы эпидемиологии и инфекционных болезней. — 1981. — Вып. 8. — С. 103—107.
2. Есипенко Б. Е., Нацик В. И., Синельник О. Д., Чайковская Л. А. Методика бескровной перфузии изолированной печени крыс // Физиол. журн. — 1981. — 27, № 6. — С. 841—843.
3. Есипенко Б. Е., Жалило Л. И., Костромина А. П., Синельник О. Д. Ионные механизмы желчеотделения. — Киев: Наук. думка, 1983. — 164 с.
4. Есипенко Б. Е., Костромина А. П., Синельник О. Д., Чайковская Л. А. Экспериментальные данные о нивелировании ионами калия угнетающего действия биологически-активных веществ на печень // I съезд гастроэнтерологов УССР, Днепропетровск, сент. 1983: Тез. докл. — Днепропетровск, 1983. — С. 126—127.
5. Есипенко Б. Е., Жалило Л. И. Структурная и функциональная гетерогенность поверхности мембран гепатоцитов // Молекулярная биология и генетика. — 1985. — Вып. 10. — С. 7—10.
6. Жалило Л. И. Желчеобразовательная функция печени при различных состояниях углеводного и водно-солевого обмена: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1972. — 25 с.
7. Жалило Л. И. Влияние ионов натрия на активность аденозинтрифосфатаз клеток печени // Физиология и патология гепатобилиарной системы. — Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1980. — С. 3—4.
8. Иващенко А. Т. Анионные аденозинтрифосфатазы. — Алма-Ата: Наука, 1982. — 138 с.
9. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 1960. — № 4. — С. 76—85.

10. Синельник О. Д., Чайковська Л. А. Вплив етакринової кислоти на жовчовидільну функцію печінки // XI з'їзд Укр. фізіол. т-ва, Дніпропетровськ, вересень, 1982: Тези доп. — Київ: Наук. думка, 1983. — С. 373.
11. Яременко М. С., Харламова О. Д. HCO_3^- -АТФаза клеток эпителия желчного пузыря кролика // Физиол. журн. — 1978.—24, № 1. — С. 67—71.
12. Aschworth C. T., Zuebel F. I., Steward S. C. The fine structure localization of adenosine triphosphatase in the small intestine, kidney and liver of the rat // J. Cell. Biol. — 1963.—17, N 1. — P. 1—18.
13. Fanestil D. D., Hastings A. B., Mahowald T. A. Environmental CO_2 stimulation of mitochondrial adenosine triphosphatase activity // J. Biol. Chem. — 1963.—238, N 10.— P. 836—843.
14. Fiske C. H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // Ibid. — 1925.—66, N 1. — P. 375—400.
15. Iritani N., Wells W. W. Studies on a HCO_3^- -stimulated ATPase and carbonic anhydrase system in rat liver lysosomes // Arch. Biochem. — 1974.—164, N 2. — P. 357—366.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951.—193, N 2. — P. 265—275.
17. Todo G., Oka H., Oda T., Ikeda Y. Subfractionation of rat liver plasma membrane. Uneven distribution of plasma membrane bound enzymes on the liver cell surface // Biochim. et biophys. acta. — 1975.—413, N 1. — P. 52—54.
18. Van Rossum G. D. V. On the coupling of respiration to cation transport in slice of rat liver // Ibid. — 1970.—205, N 1. — P. 7—17.
19. Whittembury G., Fishman I. Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused toad kidney: the effect of K, ouabain and ethacrinic acid // Pflügers. Arch. — 1969.—307, N 2. — S. 138—153.

Ин-т физиологии Киев. ун-та
им. Т. Г. Шевченко МВССО УССР

Поступила 19.11.85

УДК 612.014

В. Г. Селятицкая, Н. Г. Колосова, И. А. Герлиц,
В. Ю. Куликов, Ю. П. Шорин

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РЕАКЦИЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ИЗМЕНЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЕЧЕНИ КРЫС К ГЛЮКОКОРТИКОИДАМ ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), выступая в качестве активных модификаторов физико-химических свойств биологических мембран [2], могут играть значительную роль в изменении чувствительности тканей к регуляторным воздействиям, в частности гормональным.

При адаптации к действию низких температур у животных усиливается метаболизм [8], увеличивается синтез и секреция адаптивных гормонов [14], изменяется чувствительность тканей к гормонам: повышается к норадреналину [15] и снижается к инсулину [10]. Можно предполагать, что изменение чувствительности периферических тканей к действию гормонов — один из механизмов, лежащих в основе адаптивных перестроек метаболизма [10]. В определенной мере чувствительность связана с состоянием липидов мембран. Ранее мы показали, что при адаптации к холоду изменяются реакции ПОЛ и контролирующих их систем в печени и легких экспериментальных животных [5].

Цель настоящей работы — исследование возможной роли указанных выше изменений в модификации чувствительности клеток печени адаптированных к холоду животных к глюкокортикоидным гормонам.

Методика

Работу проводили на 120 крысах-самцах линии Вистар, полученных из питомника АМН СССР «Столбовая», массой 200—250 г. Во время адаптации к холоду животных содержали при температуре +4, +5 °C в течение 7 нед (одна экспериментальная группа). Животных остальных экспериментальных групп, а также контрольной группы со-