

Активность Na, K-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов при нарушении желчеотделительной функции печени ингибиторами синтеза белка

А. И. Масюк, Г. В. Островская, Е. Н. Долгова

Подавление синтеза белка в гепатоцитах специфическими ингибиторами, в частности циклогексимидом, пурамицином и актиномицином Д, приводит к угнетению желчеотделительной функции печени [3, 10]. Наблюдаемое при этом снижение объемной скорости желчеотока дает основание предполагать, что ингибиторы синтеза белка влияют на процессы, обеспечивающие образование жидкой части желчи. Lock и соавт. [10], обнаружившие у крыс угнетение секреции кислотнонезависимой фракции желчи при введении циклогексимида, склоны считать, что изменение скорости желчеотока в данном случае связано с ингибирующим влиянием циклогексимида на активность или синтез Na, K-АТФазы (АТФ-фосфорилазы, КФ 3.6.1.3) плазматических мембран гепатоцитов. Аналогичное предположение было сделано И. Н. Алексеевой [1], изучавшей роль синтеза белка в механизмах действия противопеченочных антител. Эти предположения основываются на современных представлениях о механизмах желчеотделения, в которых Na, K-АТФазе плазматических мембран гепатоцитов отводится важная роль [4, 9, 12]. Известно, что основной функцией Na, K-АТФазы в печени является транспорт натрия через синусоидальную и каналикулярную мембраны гепатоцитов [4]. Изменение активности этого фермента в каналикулярной мембране приводит к быстрому изменению концентрации натрия в желчи, что в свою очередь обуславливает изменение интенсивности потока воды из гепатоцитов в просвет желчных канальцев [9, 12]. В конечном итоге изменяется объемная скорость желчеотока.

Целью настоящей работы явилось изучение роли Na, K-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов в механизмах желчеотделения при нарушении биосинтеза белка в печени циклогексимидом, пурамицином и актиномицином Д.

Методика

Исследования проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г в остром опыте под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг). В отпрепарированный общий желчный проток через надрез его стенки вводили тонкую металлическую иглу. К ней присоединяли полиэтиленовую трубку, сообщенную с микропипеткой. Определяли количество желчи, выделившееся в течение 15 мин. Рассчитывали объемную скорость желчеотока ($\text{мкл} \cdot \text{мин}^{-1}$ на 1 г ткани печени).

Исследование желчеотделительной функции печени крыс при инфузии в воротную вену ингибиторов синтеза белка проводили в следующем варианте опыта. Через 30 мин после канюлирования общего желчного протока определяли исходный уровень желчеотделения. Для этого измеряли количество выделившейся желчи (мкл) в течение трех 15-минутных интервалов и впоследствии пересчитывали на 1 г печени в минуту. В течение последующих 30 мин осуществляли инфузию в воротную вену одного из ингибиторов синтеза белка. Отсчет времени, в течение которого наблюдали за изменением скорости желчеотока, начинался с момента инфузии ингибиторов синтеза белка. Наблюдения вели в течение 2 ч. Изменение объемной скорости желчеотока за каждый определенный период времени оценивали по разнице между значениями исходной скорости желчеотока и скорости в данный момент наблюдений.

После определения исходной скорости желчеотока осуществляли инфузию актиномицина Д, пурамицина и циклогексимида (5, 200 и 200 мкг/100 г соответственно) в воротную вену в течение 30 мин с помощью специального приспособления. Скорость желчеотока регистрировали в течение 2 ч. Через 2 ч после начала инфузии животных умерщвляли, печень промывали охлажденным 0,9 %-ным раствором NaCl, клетки печени разрушали гомогенизацией, плазматические мембраны гепатоцитов получали

дифференциальным центрифугированием гомогената в ступенчатом градиенте сахарозы. Собирали фракции плазматических мембран, расположенные в виде полос между слоями сахарозы плотностью 1,16 и 1,18 г/см³, — фракция I и 1,18 и 1,20 г/см³ — фракция II. После тщательной отмывки полученных фракций бидистиллированной водой измеряли их ферментативную активность по количеству неорганического фосфора, выделившегося в результате реакции [11]. Общую АТФазную активность определяли в среде, содержащей (ммоль): NaCl — 120; MgCl₂ — 5; KCl — 12,5; ЭГТА — 0,5; трис-HCl — 125, pH 7,4; АТФ — 5; белок — 50 мкг при температуре 37 °С (общий объем смеси — 1,5 мл). Реакцию начинали добавлением АТФ, останавливали через 10 мин добавлением ТХУ и помещением пробирок с реакционной смесью в ледяную баню. Для определения активности Na, K-АТФазы в инкубационную среду добавляли 10⁻⁴ моль убаина. Активность Na, K-АТФазы рассчитывали по разности значений АТФазной активности, полученных в среде без убаина и с таковым. Активность 5'-нуклеотидазы определяли в среде, содержащей (ммоль): MgCl₂ — 1; АМФ — 4; трис-HCl — 50, pH 7,5; белок — 50 мкг. Среда для определения глюкозо-6-фосфатазы содержала (ммоль) глюкозо-6-фосфат — 20; NaF — 1; ЭДТА — 4, pH 6,7; белок — 50 мкг. Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) определяли в среде, содержащей сахарозу — 0,25 моль; трис-HCl — 50 ммоль, pH 7,6 при температуре 30 °С; сукцинат натрия — 20 ммоль; NaN₃ — 2,1 мг/мл; белок — 100 мкг. После 20 мин преинкубации при температуре 30 °С активность СДГ измеряли при длине волны 600 нм и наличии феназинметасульфата (0,1 ммоль) и 2,6-дихлорфенолиндифенолята натрия (15 ммоль). Конечный объем смеси составил 2 мл. Для расчета активности использовали значение снижения оптической плотности за 1 мин на 1 мг белка.

Результаты и их обсуждение

О характере изменений желчеотделительной функции печени, вызываемых инфузией в воротную вену ингибиторов синтеза белка, можно судить по результатам, представленным на рис. 1. Показано, что скорость желчеотока снижается к моменту окончания инфузии любого из использованных ингибиторов синтеза белка и сохраняется на низком уровне в течение всего эксперимента. К окончанию инфузии актиномицина Д наблюдается снижение объемной скорости желчеотока на 37 %. При инфузии пуромицина скорость желчеотока снижается на 31 %. Через 30 мин после инфузии циклогексимида скорость желчеотока снизилась на 23 %. За два часа опыта после инфузии актиномицина Д, пуромицина и циклогексимида скорость желчеотока снизилась на 49, 43 и 55 % соответственно.

Снижение скорости желчеотока под влиянием ингибиторов синтеза белка наблюдается в течение достаточно длительного времени [1, 3, 10]. Но наиболее существенные изменения желчеотделительной функции печени происходят в первые два часа после их инфузии. Поэтому мы сочли целесообразным определить активность Na, K-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов через два часа после начала инфузии циклогексимида, пуромицина и актиномицина Д. Поскольку установлено, что Na, K-АТФаза каналикулярных мембран играет важную роль в механизмах желчеотделения, определяли Na, K-АТФазную активность именно этой фракции. При дифференциальном центрифугировании последняя обнаруживалась между слоями сахарозы плотностью 1,16 и 1,18 г/см³ (фракция I). Фракция II, находящаяся на границе плотностей сахарозы 1,18 и 1,20 г/см³ наряду с мембранами эндоплазматического ретикулума и митохондрий, обогащена синусоидальными и латеральными мембранами гепатоцитов. Для каждой из этих фракций характерна определенная активность маркерных ферментов. Каналикулярные мембраны гепатоцитов имеют высокую активность Na, K-АТФазы (61,7 нм Р_н·мг⁻¹·мин⁻¹) и 5'-нуклеотидазы (966,5 нм·мг⁻¹·мин⁻¹). Активность этих ферментов в каналикулярных мембранах в 6,4 и 7,7 раза соответственно выше их активности, определяемой в гомогенате печени. Эти результаты хорошо согласуются с данными исследований других авторов [6]. Фракция каналикулярных мембран не обладает активностью глюкозо-6-фосфатазы (маркерного фермента эндоплазматичес-

кого ретикулума), тогда как в гомогенате ее активность составляет $204,8 \text{ нм Р}_n \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, и обладает низкой активностью СДГ (маркерного фермента митохондрий), что в 6,7 раза ниже, чем в гомогенате и в 10,4 — чем во фракции II. Такая активность маркерных ферментов свидетельствует о высокой степени очистки плазматических мембран от примесей мембран эндоплазматического ретикулума и митохондрий.

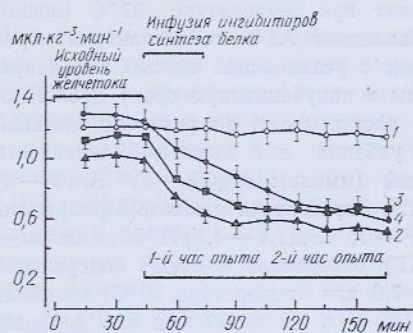


Рис. 1. Изменение объемной скорости желчетока при инфузии ингибиторов синтеза белка:

1 — контроль (0,9%-ный NaCl, 2 — актиномицин Д, 3 — пурамицин, 4 — циклогексимид.

Влияние ингибиторов синтеза белка на активность Na, К-АТФазы каналикулярных мембран гепатоцитов, $\text{нм Р}_n \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$

Ингибитор	Контроль	Инфузия ингибитора	P
Циклогексимид (n=6)	$51,2 \pm 7,4$	$28,3 \pm 2,9$	$<0,05$
Пурамицин (n=7)	$43,3 \pm 8,8$	$46,7 \pm 9,0$	$>0,5$
Актиномицин Д (n=5)	$48,3 \pm 2,4$	$24,2 \pm 3,6$	$<0,02$

Примечание. n — число животных.

Электронно-микроскопический анализ полученной фракции каналикулярных мембран гепатоцитов, проведенный Т. И. Богдановой (Научно-исследовательский институт эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР), показал, что они представляют собой замкнутые везикулы и не содержат примесей других мембран (рис. 2).

Как мы уже отмечали, активность Na, К-АТФазы фракции каналикулярных мембран гепатоцитов у интактных животных составляет $61,7 \text{ нм Р}_n \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, у животных контрольной группы она несколько ниже (таблица). По-видимому, это снижение активности фермента связано с условиями проведения острого опыта прежде всего с пребыванием животных в течение нескольких часов под наркозом.

Определение активности Na, К-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов при нарушении желчеотделительной функции печени ингибиторами синтеза белка показало, что инфузия актиномицина Д и циклогексимида вызывает резкое снижение активности Na, К-АТФазы фракции каналикулярных мембран гепатоцитов. В результате инфузии актиномицина Д активность фермента снижается в 2 раза, циклогексимида — в 1,8 раза. При инфузии пурамицина активность Na, К-АТФазы в исследуемый период времени не изменяется (см. таблицу).

Таким образом, представленные выше результаты подтверждают ранее высказанное предположение [10] о важной роли Na, К-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов в изменении желчеотделительной функции печени при нарушении синтеза белка в гепатоцитах циклогексимидом. Они свидетельствуют также о том, что изменение желчеотделительной функции печени, вызываемое нарушением в гепатоцитах макромолекулярного синтеза с помощью актиномицина Д, сопряжено с изменением активности Na, К-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов. Как известно, актиномицин Д изменяет характер синтеза белка в клетке, способствуя образованию комплексов с ДНК, вследствие чего синтез мРНК останавливается. Биосинтез белка при этом угнетается примерно на 40 %, однако полностью не прекращается, в связи с наличием ранее синтезированных и долгоживущих мРНК [7]. Пурамицин, имеющий структурную аналогию с тРНК, прекращает сборку белковых молекул на рибосомах, в результате освобождения которых в клетке накапливаются незавершенные полипептиды. При низких дозах пурамицина часть таких полипептидов имеет достаточно большую мо-

лекулярную массу, однако ферментативной или биологической активностью они не обладают. В животной клетке пурамицин подавляет синтез белка быстро, но обратимо [5]. Циклогексимид обладает наиболее сильным угнетающим действием на биосинтез белка в клетке. Интенсивность синтеза белка под влиянием циклогексимида снижается на 80—90 %. Недостроенные полипептиды в этом случае остаются на рибосомах [8].

По-видимому, изменение активности Na, K-АТФазы, наблюдаемое в результате инфузии ингибиторов синтеза белка, связано не с нарушени-



Рис. 2. Электронно-микроскопический анализ фракции каналикулярных мембран гепатоцитов. $\times 50\,000$.

ем синтеза молекул фермента, а с нарушением синтеза низкомолекулярных регуляторных белков. Известно, что синтез и встраивание вновь синтезированных молекул Na, K-АТФазы в плазматическую мембрану требуют относительно длительного времени. Матричные РНК для подобного рода ферментов являются, как правило, долгоживущими. В таких случаях активность этих ферментов практически не зависит от нарушения синтеза мРНК актиномицином Д. И, напротив, актиномицин Д, нарушая синтез короткоживущих мРНК для регуляторных белков (активаторов и репрессоров), способен оказать заметное влияние на ферментативные процессы. Факт снижения активности Na, K-АТФазы свидетельствует в пользу того, что в данном случае нарушен синтез короткоживущих мРНК для белков-регуляторов этого фермента. Циклогексимид, вызывающий резкое угнетение синтеза белка в клетке, по-видимому, нарушает и синтез таких регуляторных белков, в результате чего активность Na, K-АТФазы снижается.

Как было показано нами ранее [3], влияние пурамицина на желчеотделительную функцию печени является быстрым, но обратимым. Поэтому тот факт, что изменения активности Na, K-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов не наблюдаются через 2 ч после начала инфузии пурамицина, можно связать с восстановлением синтеза регуляторных белков.

Таким образом, одним из возможных механизмов угнетения желчеотделительной функции печени крыс при инфузии ингибиторов синтеза белка может быть нарушение синтеза низкомолекулярных регуляторных белков, способных изменить активность Na, K-АТФазы плазматических мембран гепатоцитов. Регуляция активности Na, K-АТФазы плазматических мембран эндогенными низкомолекулярными регуляторными факторами белковой природы описана рядом исследователей [2].