

УДК 612.3:576.5:577.352.456

О.Д.Синельник, Б.Є.Єсипенко, Т.М.Коваленко

Питання про шляхи надходження іонів натрію з крові в жовч. Експериментальний аналіз

Представлены результаты исследования функции натрийтранспортирующих систем гепатоцитов и состояния проницаемости парацеллюлярного пути в условиях стимуляции транспорта натрия в желчь. Установлено, что при инкубации срезов печени строфантин К (от 10^{-5} до 10^{-4} моль/л) оказывает различное влияние на содержание натрия и калия в гепатоцитах нормальных крыс и крыс с экспериментальным холестазом, вызванным α -нафтилизотиоцианатом (клеточная модель с нефункционирующими каналькулярными мембранами). После инфузии раствора хлористого лантана в воротную вену изолированной печени крысы в условиях гиперхолестереза, вызванного этакриновой кислоты, который сопровождается повышением экскреции натрия и его концентрации в желчи, локализация электронноплотной метки в области межклеточных контактов гепатоцитов не отличается от контрольной. Результаты свидетельствуют о билатеральной локализации систем активного транспорта натрия в гепатоцитах и существенности вклада трансцеллюлярного транспорта натрия в его суммарное поступление в желчь.

Вступ

Питання про шляхи надходження іонів натрію з крові в жовч тісно пов'язане з проблемою утворення канальцевої (первинної) жовчі, що формується в жовчних канальцях, просвіт яких утворено апікальними мембранами суміжних двох або трьох гепатоцитів. Рушійною силою секреції канальцевої жовчі вважають активний транспорт із гепатоцитів органічних речовин (головним чином жовчних кислот) і неорганічних іонів, внаслідок якого утворюється осмотичний градієнт для виходу в канальці води. Значення окремих іонів у секреції жовчі точно не з'ясовано через недостатню вивченість систем їх транспорту в мембранах гепатоцитів. Не існує єдиної думки щодо механізму транспорту з крові в жовчні канальці іонів натрію — одного з основних осмотичноактивних компонентів жовчі: відбувається він транс- чи парацелюлярно. В останньому випадку їх надходження в канальці через щільні контакти є пасивним і на розвиток осмотичного градієнту не впливає. Існуюча невизначеність зумовлена суперечливістю результатів визначення локалізації системи активного транспорту натрію в плазматичних мембранах гепатоцитів.

Гістохімічні дослідження встановили локалізацію Na^+ , K^+ -АТФази в синусоїдальних мембранах [7]. У високоочищених препаратах мембран гепатоцитів Na^+ , K^+ -АТФаза була виявлена біохімічно також лише у фракції синусоїдальних мембран [12]. Це стало підставою вважати основним шляхом надходження натрію з крові в жовчні канальці парацелюлярний. На можливість парацелюлярного транспорту іонів і води в жовч вказують більш висока електропровідність щільних контактів гепатоцитів порівняно з електропровідністю синусоїдальних і каналькулярних мембран [9], а також підвищена проникність щільних контактів гепатоцитів для розчину

хлористого лантану, електроннощільного маркера, за умов холерезу, викликаного жовчними кислотами [10].

Подальше імунохімічне визначення Na^+ , K^+ -АТФази із використанням Na^+ , K^+ -АТФ-специфічних антитіл і біохімічне, проведене із застосуванням детергентів, встановили білатеральну локалізацію ферменту в гепатоцитах — на синусоїдальному та каналікулярному полюсах [14, 15]. Проте в інших дослідженнях, здійснених за допомогою аналогічної методики, не виявлено активності Na^+ , K^+ -АТФази в каналікулярних мембранах [13]. Такі суперечливості залишають не вирішеним питання про механізм транспорту іонів натрію з крові в жовч та їх роль в утворенні каналцевої жовчі.

Ми поставили мету проаналізувати це питання, досліджуючи функцію натрійтранспортуючих систем у гепатоцитах і стан проникності парацелюлярного шляху за умов стимуляції транспорту цих іонів у жовч.

Методика

В експериментах на інкубованих тонких зрізах печінки білих щурів масою 200—220 г з метою виявлення функції системи активного транспорту каналікулярних мембран було порівняно дію строфантину К на вміст натрію та калію в нормальних гепатоцитах і в їх клітинній моделі з нефункціонуючими каналікулярними мембранами. Така модель формується за умов експериментального холестаза, викликаного α -нафтилізотиоціанатом [6], одноразово введеним перорально у вигляді 2 %-вого розчину в рослинній олії в дозі 100 мк/кг.

Тонкі зрізи печінки щурів нормальних і з експериментальним холестазом (через 48 год після введення α -нафтилізотиоціанату) інкубували протягом 1 год в Кребса—Рінгера-фосфатному буфері при 37 °С, а потім в аналогічному розчині (45 хв), що містив строфантин К (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} моль/л) і 0,5 % інуліну. Визначали об'єм позаклітинного простору та розраховували вміст натрію й калію в гепатоцитах [16].

Стан проникності парацелюлярного шляху досліджували за допомогою методу інфузії розчину хлористого лантану в ворітну вену ізольованої печінки щура за умов гіперхолерезу із підвищенням екскреції натрію з жовччю — під дією етакринової кислоти. Для оцінки відкритості міжклітинних контактів за цих умов досліджено також характер дифузії часток колоїдного лантану в препаратах печінки, фіксованих у розчині глутаральдегіду в присутності колоїдного лантану.

Перфузію ізольованої печінки [1] здійснювали через ворітну вену розчином, що містив поліглюкін, геосен та розчин Кребса у співвідношенні 1:1:2 (об'єм 400 мл) із швидкістю проходження через орган близько 45 мл/хв. Етакринову кислоту (10^{-4} моль/л) вводили в перфузат через 50 хв після початку перфузії.

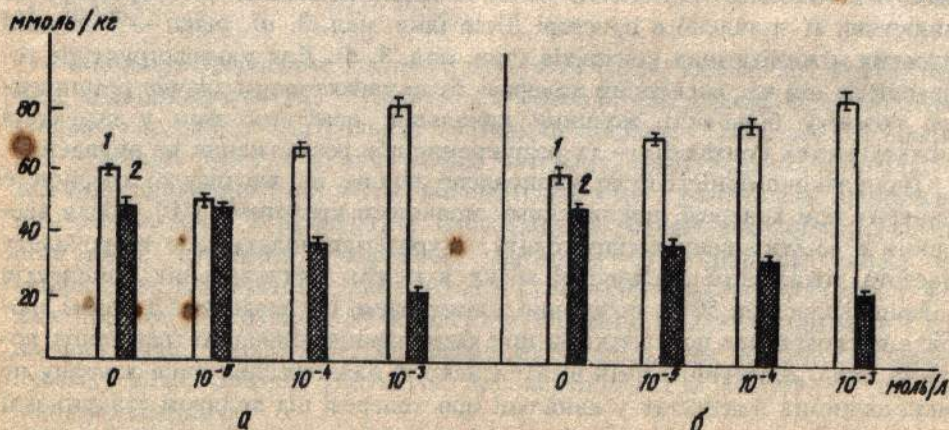
Інфузію хлористого лантану здійснювали таким чином [10]: розчин хлористого лантану (5 ммоль/л) у *tris*-буфері; а також (ммоль/л) Na^+ — 133; K^+ — 3,5; Ca^{2+} — 4,5; *tris*-Cl — 5 (рН 7,4) вводили в ворітну вену через 20 хв після введення етакринової кислоти (під час максимального підвищення швидкості жовчовиділення) протягом 3 хв. Далі, протягом 30 с вводили розчин 2,5 %-вого глутаральдегіду в 0,1 моль/л какодилатному буфері, охолодженому до 4 °С. Зрізи печінки дофіксували в 1 %-вому OsO_4 , проводили через спирти та абсолютний ацетон й заливали в суміш, що включала епон та аралдіт. Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю.

Фіксацію печінки здійснювали в присутності колоїдного лантану [5]. Через 20 хв після введення в перфузат етакринової кислоти зрізи печінки фіксували в суміші 3,5 %-вого розчину глутаральдегіду та 1—1,5 %-вого розчину колоїдного лантану. Розчин колоїдного лантану було введено також у какодилатний буфер, осмієво-какодилатний розчин, у 70 %-вий спирт. Тканину заливали в суміш епону та аралдиту. Зрізи вивчали в електронному мікроскопі JEM-100 CX.

Результати та їх обговорення

Na^+ , K^+ -АТФаза каналікулярних мембран гепатоцитів, якщо вона дійсно локалізована на цьому полюсі клітин, у відсутності детергентів до оубаїну чи строфантину К не чутлива. Це узгоджується із стимулюючою, а не гальмуючою, дією цих препаратів (10^{-5} , 10^{-4} моль/л) на екскрецію натрію з жовччю [2, 8]. Одним з пояснень такої стимуляції є активація Na^+ , K^+ -АТФази каналікулярних мембран внаслідок підвищення в гепатоцитах вмісту натрію після блокади Na^+ , K^+ -наосу синусоїдальних мембран. З метою виявлення функції натрійтранспортуючої системи каналікулярних мембран ми порівняли вплив строфантину К на вміст натрію і калію в гепатоцитах шурів нормальних та з експериментальним холестазом, викликаним α -нафтилізотиоціанатом. Особливістю зазначеної форми холестазу є пошкодження ультраструктури мембран гепатоцитів, у значній мірі селективне, на каналікулярному полюсі [4]. Повна функціональна блокада каналікулярних мембран гепатоцитів при цьому підтверджується відсутністю ефектів сильних холеретиків (жовчних кислот, етакринової кислоти тощо). У попередніх дослідженнях було встановлено, що в таких гепатоцитах зберігаються процеси активного транспорту натрію та калію, які блокуються строфантинем К [6]. Їх було віднесено до функції Na^+ , K^+ -АТФази синусоїдальних мембран.

Як виявилось, із підвищенням концентрації строфантину К від 10^{-5} до 10^{-3} моль/л у розчині інкубації зрізів печінки вміст натрію у гепатоцитах із нефункціонуючими каналікулярними мембранами закономірно підвищувався, калію — знижувався (мал. 1, б), що вказує на посилення гальмування Na^+ , K^+ -наосу синусоїдальних мембран. У нормальних гепатоцитах гальмівний вплив строфантину К у концентрації 10^{-4} моль/л менший, а при його концентрації 10^{-5} моль/л — відсутній (див. мал. 1, а).



Мал. 1. Вміст (ммоль/кг) натрію (1) та калію (2) у гепатоцитах при різній концентрації строфантину К у середовищі інкубації зрізів печінки шурів: а — нормальних шурів; б — з експериментальним холестазом.

В останньому випадку відзначено вірогідне зниження вмісту натрію в гепатоцитах, що свідчить про стимуляцію активного транспорту натрію з клітин. Знайдені відміни вказують на наявність у каналікулярних мембранах гепатоцитів системи активного транспорту натрію, чутливої до змін його вмісту в клітинах. Активацію під час дії строфантину К можна розглядати як регуляторну відповідь, спрямовану на підтримку натрієвого гомеостазу в гепатоцитах.

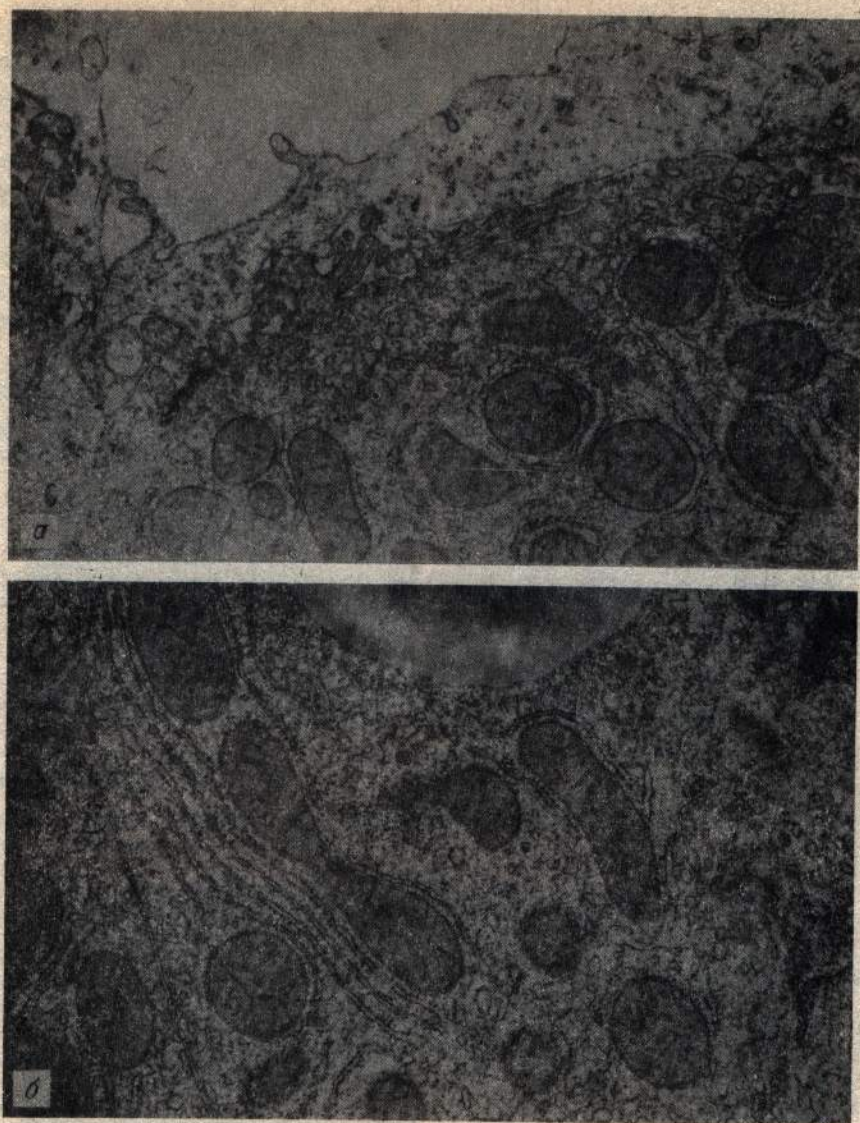
Після застосування високої концентрації строфантину К (10^{-3} моль/л) зміни вмісту натрію та калію в гепатоцитах були в обох випадках тотожними. В цій ситуації регуляторна відповідь системи активного транспорту натрію каналікулярних мембран, які становлять 13 % загальної поверхні гепатоцита, можливо, є недостатньою для компенсації функції загальмованої Na^+ , K^+ -АТФази синусоїдальних мембран, внаслідок чого прояв її активності не виявляється.

Досліджування проникності парацелюлярного шляху за умов підвищення екскреції натрію з жовччю під впливом етакринової кислоти було проведено з використанням методу інфузії розчину хлористого лантану в ворітну вену. Етакринова кислота, препарат, відомий як діуретик, у концентрації 10^{-4} моль/л викликає значний холерез (максимальне підвищення швидкості жовчовідділення становить 200 %) із значним підвищенням екскреції натрію та його концентрації в жовчі [2]. Одним із числених ефектів цього препарату на функції клітин є підвищення проникності міжклітинних контактів, встановлене на епітелії сечового міхура та проксимальних каналців нирки [3]. Можна було очікувати, що в разі виключно парацелюлярного надходження іонів натрію з крові в жовчні каналці, посилення його екскреції з жовччю під впливом етакринової кислоти буде пов'язаним із підвищенням проникності міжклітинних контактів.

При нестимульованому жовчовідділенні, як встановлено раніше, після інфузії в ворітну вену ізольованої печінки щура розчину хлористого лантану електроннощільна мітка виявляється головним чином у просторі Діссе, рідко — в межах простих контактів і дуже рідко — в ділянці з'єднувальних комплексів [10].

У контрольних дослідах лантанову мітку було виявлено в межах ендотелію синусоїдів та простору Діссе (мал. 2, а), зрідка — в ділянці простих міжклітинних контактів (див. мал. 2, б). Після введення розчину хлористого лантану за умов гіперхолерезу, викликаного етакриновою кислотою, змін в локалізації лантанової мітки в межах позаклітинного простору не виявлено: її знайдено в просторі Діссе (див. мал. 3, а), рідко — в ділянці простих міжклітинних контактів (див. мал. 3, б). Для ультраструктури гепатоцитів під час дослідного холерезу було характерним значне розширення просвіту більшості жовчних каналців, помітних змін у структурі міжклітинних контактів — їх розширення або розходження не виявлено.

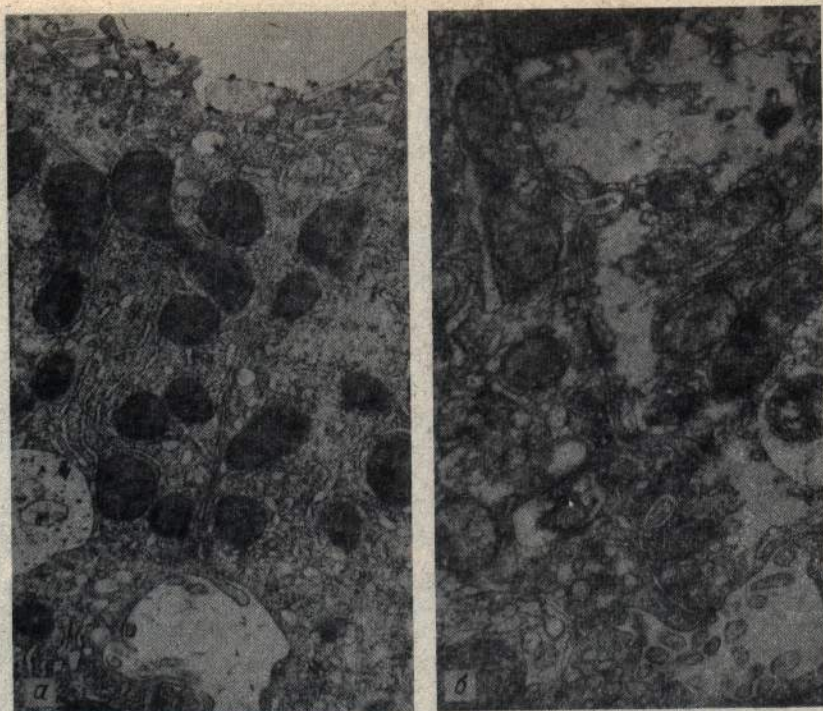
Іншу закономірність було встановлено раніше, під час інфузії хлористого лантану при холерезі, викликаному жовчними кислотами [10]. Після введення в ворітну вену дегідрохолату, тауродегідрохолату, або таурохолату частота локалізації лантанової мітки в межах з'єднувальних комплексів підвищувалася на 50 % порівняно з контролем, що дозволило авторам зробити висновок про посилення за цих умов парацелюлярного транспорту води та іонів. Відсутність змін в інтенсивності надходження іонів лантану по міжклітинних контактах у каналці при холерезі під впливом етакринової кислоти свідчить про те, що значне підвищення екскреції натрію з жовччю в даному випадку не може бути наслідком стимуляції його парацелюлярного транспорту.



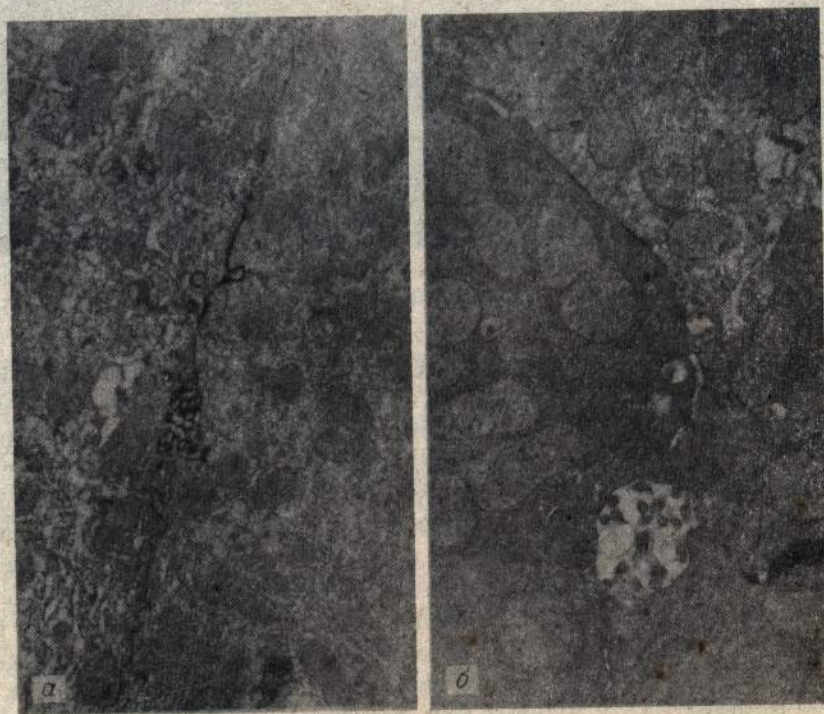
Мал. 2. Локалізація лантанової мітки в печінці за контрольних умов: а — зб. 21000; б — зб. 28000.

На користь зробленого висновку вказують також особливості дифузії часток колоїдного лантану в препаратах печінки, фіксованих після дії етакринової кислоти. У контрольних зразках печінки колоїдний лантан проникав у просвіт простих міжклітинних контактів, з'єднувальних комплексів, жовчних канальців (мал. 4, а), що співпадає з його розподілом, встановленим раніше [11]. У препаратах, фіксованих у розчині з колоїдним лантаном після введення етакринової кислоти, його дифузія майже не відбувалась: електроннощільна мітка в невеликій кількості виявлена в межах простих контактів й була відсутня в ділянці щільних контактів і канальців (див. мал. 4, б). Це може бути наслідком деякого звуження просвіту міжклітинних контактів, яке перешкоджало дифузії часток колоїдного лантану.

Отримані результати дозволяють вважати, що під час холерезу, викликаного етакриновою кислотою, надходження натрію в жовчні канальці посилюється внаслідок стимуляції його трансцелюлярного надходження, а та-



Мал. 3. Локалізація лантанової мітки в печінці під час холерезу, викликаного етакриною кислотою: *a* — зб. 28000; *б* — зб. 30000.



Мал. 4. Розподіл колоїдного лантану в зразках печінки за контрольних умов (*a* — зб. 21000) і після дії етакриною кислоти (*б* — зб. 30000).

кож припустити участь у цьому процесі Na^+ , K^+ -АТФази каналікулярних мембран. Не виключено, що причиною посилення активного транспорту натрію в каналці в даному випадку є також підвищення вмісту натрію в гепатоцитах, оскільки є дані про здатність етакринової кислоти підвищувати проникність клітинних мембран для цих катіонів.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про білатеральну локалізацію систем активного транспорту натрію в гепатоцитах й істотний вклад трансцелюлярного транспорту іонів натрію в загальне надходження їх у каналці, що важливо для встановлення факторів, які визначають інтенсивність секреції каналцевої жовчі.

O.D.Sinelnik, B.E.Esipenko, T.N.Kovalenko

EXPERIMENTAL ANALYSIS OF THE PROBLEM ON THE WAYS OF SODIUM IONS TRANSPORT FROM BLOOD TO BILE

The function of sodium-transporting hepatocytic systems and state of the paracellular way penetrability have been studied under conditions of stimulation of the sodium transport to bile. It has been found that during incubation of the liver slices strophanthin K (10^{-5} — 10^{-4} M) influences differently the sodium and potassium content in hepatocytes of normal rats and rats with experimental cholestasis induced by α -naphthylisothiocyanate (a cellular model with nonfunctioning canalicular membranes). After infusion of the lanthanum chloride solution to the portal vein of the isolated rat liver under conditions of hypercholesterolemia and ethacrinic acid effect accompanied by intensification of sodium excretion and increase of its concentration in the bile, localization of an electron-dense label in the range of intercellular contacts of hepatocytes does not differ from the control one. The data obtained confirm bilateral localization of the active sodium transport systems in hepatocytes and significance of the contribution made by the transcellular transport of sodium to its total transport to the bile.

Research Institute of Physiology at the Taras Shevchenko University,
Ministry of Education of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Есипенко Б.Е., Нацик В.И., Синельник О.Д., Чайковская Л.А. Методика бескровной перфузии изолированной печени крысы // Физиол. журн. — 1981. — 27, № 6. — С. 841—843.
2. Есипенко Б.Е., Жаліло Л.И., Костромина А.П., Синельник О.Д. Натрийтранспортирующие системы гепатоцитов и их роль в желчеотделительной функции печени // Там же. — 1986. — 32, № 5. — С. 529—533.
3. Лебедев А.А. Новые представления о функции нефрона и механизме действия диуретиков // Фармакология и токсикология. — 1990. — 53, № 2. — С. 8—13.
4. Макарова Н.И., Горштейн Э.С., Качко Л.Х. Ультраструктурные изменения гепатоцитов крыс при поражении α -нафтилизотиоцианатом // Ультраструктурная патология печени. — Рига: Зинатне, 1984. — С. 85—88.
5. Шаров В.Г. Использование коллоидного лантана в качестве электронномикроскопического трейсера // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1981. — 88, № 1. — С. 757—759.
6. А.с. 1335780 СССР, МКИ⁴ G 01 № 33/50. Способ изучения транспорта веществ через синусоидальные мембраны гепатоцитов / Синельник О.Д., Есипенко Б.Е., Лысенко И.В., Синельник Б.Ф. — Опубл. 23.05.92, Бюлл. № 19.
7. Blitzer B.L., Boyer J.L. Cytochemical localisation of Na^+ , K^+ -ATPase in the rat hepatocytes // J.Clin. Invest. — 1978. — 62. — P. 1101—1104.
8. Graf J., Peterlik K.M. Oubain-mediated sodium uptake and bile formation by isolated perfused rat liver // Amer. J.Physiol. — 1976. — 230, № 4. — P. 876—885.
9. Graf J., Henderson R.M., Krumholz B., Boyer J.L. Cell membrane and transepithelial voltage and resistances in isolated rat hepatocyte couplets // J.Membrane Biol. — 1987. — 95. — P. 247—254.
10. Layden T.J., Elias E., Boyer J.L. Bile formation in the rat. The role of the paracellular shunt pathway // J.Clin. Invest. — 1978. — 62. — P. 1357—1385.
11. Matter A., Orci L., Rouiller C.A. Study on the permeability barriers between Disse's space and bile canaliculus // J.Ultrastruct. Res. — 1969. — 11. — P. 1—71.

12. Meier P.J., Sztul E.S., Reubeu A., Boyer J.L. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver // J.Cell. Biol. — 1984. — 98. — P. 991—999.
13. Nathanson M., Boyer J. Mechanisms and regulation of bile secretion // Hepatologie. — 1991. — 14, № 3. — P. 551—566.
14. Sutherland E., Dixon B.S., Loeffert H.L. et al. Biochemical localization of Hepatic surface-membrane Na^+ , K^+ -ATPase activity depends on membrane lipid fluidity // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1988. — 85, № 22. — P. 8673—8677.
15. Takemura S., Omori C.K., Tanaka K. Quantitative immunoferritin localization of Na^+ , K^+ -ATPase on canine hepatocytes // J.Cell. Biol. — 1984. — 99. — P. 1502—1510.
16. Van Rossum J.D.V. Net sodium and potassium movement in liver slices prepared from rats of different foetal and postnatal ages // Biochim. et biophys. acta. — 1963. — 74. — P. 1—14.

Наук.-дослід. ін-т фізіології Київ. ун-ту ім. Тараса Шевченка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 10.06.93

УДК 612.821

М.В.Макаренко

Залежність льотного навчання курсантів від індивідуальних психофізіологічних властивостей

Результаты сопоставления параметров психофизиологических функций курсантов авиационного училища с их успешностью приобретения навыков пилотирования показали тесную корреляционную связь. Установлено, что ряд характеристик высшей нервной деятельности, параметров сложных координационно-двигательных актов являются физиолого-психологической основой, обуславливающей успешность обучения профессиональной деятельности операторов по управлению подвижными летательными системами. Дано описание уравнений множественно-корреляционного анализа для прогнозирования успешности летного обучения курсантов.

Вступ

Результативність складної операторської діяльності залежить від індивідуальних властивостей людини. Тому найбільш високі вимоги ставляться спеціалістам по керуванню динамічними об'єктами та системами. Це викликає потребу визначити зв'язок успішності набуття професійних навиків і використання їх у практичній діяльності з властивостями особистості операторів, у тому числі з їх характеристиками психофізіологічних функцій. Результати зіставлення кількісної оцінки ефективності трудової діяльності з параметрами основних властивостей нервових процесів, показниками нейро- та психомоторики, особливостями вегетативного реагування на навантаження різного ступеня складності тощо можуть бути доказом обґрунтування розробки теоретичних основ практичних питань, реалізація яких повинна здійснюватися в системі заходів по профорієнтації та профвідбору, оцінці функціонального стану та навчання людини. Це, в свою чергу, спрямовано на підвищення ефективності праці, скорочення строків підготовки