

Г.А.Скрябин*, С.Н.Орлов[#], Г.Г.Ряжский*, Н.И.Покудин*, И.Бертъем[#],
А.Г.Чучалин*

ФЛОРЕТИН ИНГИБИРУЕТ ВХОД Na^+ И K^+ В АЛЬВЕОЦИТЫ II ТИПА ЧЕРЕЗ СНИЖЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ АТФ

* НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва;

[#] Исследовательский Центр Университета г.Монреаль, Канада

PHLORETIN INHIBITS Na^+ AND K^+ UPTAKE IN ALVEOLAR EPITHELIAL TYPE CELLS VIA A REDUCTION OF CELLULAR ATP CONTENT

G.A.Skryabin*, S.N.Orlov[#], G.G.Ryazhsky*, N.I.Pokudin*, I.Bertjem[#], A.G.Chuchalin*

Summary

Bipolar organic compound phloretin has a marked effect on transport and cellular metabolism of glucose, uptake of non-metabolized glucose analogs and epithelial cell growth. We have studied effect of phloretin on Na^+ and Rb^+ uptake in rat alveolar epithelial type cells. Type cells were isolated by elastase digestion, purified by a differential adherential technique and then cultured on plastic in Dulbeccos medium with 10% fetal bovin serum. $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ were used as tracers for Na^+ and K^+ accumulation in the presence or absence of phloretin (0–250 μM). The ATP content was determined by the adapted firefly luciferase assay.

Incubation of type cells with various concentration of phloretin leads to inhibition of Na and Rb uptake and a reduction of cellular ATP content. The effect is present in the presence and absence of external glucose and maximum inhibition was detected at a concentration of 250 μM . Sodium uptake was decreased from 46.0 ± 2.7 in control up to 5.5 ± 0.8 nmol/mg protein/5 min in the presence of 250 mM of phloretin and rubidium/ potassium uptake was decreased from 35.3 ± 2.8 to 1.8 nmol/mg protein /15 min. At the same concentration of drug cellular ATP content was reduced from 0.96 ± 0.16 to 0.03 ± 0.02 nmol/mg protein. These results indicate that phloretin induces a reduction in cellular ATP content which lead to decrease in Na^+ and K^+ uptake in type II epithelial cells.

Резюме

Флоретин, диполярный органический комплекс способен ингибировать транспорт и клеточный метаболизм глюкозы, накопление неметаболизируемых аналогов глюкозы и транспорт Na^+ в различных типах клеток. Мы обнаружили, что в альвеоцитах 2 типа флоретин в значительной степени ингибирует вход как Na^+ , так и K^+ . Используемые в работе альвеоциты 2 типа изолировались с помощью ферментации эластазой, очищались посредством дифференциальной адгезирующей технологии и культивировались на пластике в среде Дульбекко в присутствии 10% бычьей сыворотки. В качестве меток для Na^+ и K^+ мы использовали $^{22}\text{Na}^+$ и $^{86}\text{Rb}^+$. Внутриклеточное содержание АТФ определяли с помощью адаптированной люциферин-лициферазной реакции.

Было обнаружено, что инкубация альвеоцитов 2 типа в присутствии различных концентраций флоретина приводит к снижению входа Na^+ и K^+ одновременно с падением уровня содержания внутриклеточного АТФ. Наибольший эффект наблюдался в присутствии 250 μM флоретина. Результаты свидетельствуют, что флоретин вызывает снижение уровня внутриклеточного АТФ и это ведет к ингибированию накопления Na^+ и K^+ в альвеоциты 2 типа.

Введение

Эффективный газовый обмен через альвеолярный эпителий зависит от поддержания легочной поверхности относительно свободной от жидкости. Эксперименты, проведенные с использованием изолированных легких [1,26], легочных долей [2] и *in vivo* [31,37] подтверждают, что активный транспорт Na лежит в основе переноса жидкости через легочный эпителий. Согласно общепринятой гипотезе абсорбция жидкости следует за транспортом Na^+ через Na^+ -

канал, локализованный на апикальной мембране альвеолярной эпителиальной клетки [23]. Далее, ион Na^+ выводится из клетки с помощью Na^+ - K^+ -АТФазы, локализованной на базальной стороне альвеоцита II типа [23].

В настоящее время уже идентифицировано несколько ион-транспортующих систем, вовлеченных в транспорт Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану альвеолярной эпителиальной клетки II типа. Na^+ -канал, ингибируемый низкими концентрациями амилорида или его структурных аналогов [23] и активируемый

β_2 -адренергическими агонистами [41], рассматривается как основной диффузионный путь для входа Na^+ . Другим механизмом входа Na^+ считается электро-нейтральный Na^+-H^+ -антипортер. Однако было показано, что этот переносчик активируется в монослое альвеоцитов II типа крысы [7] и в суспензии клеток [29] только при внешнем закислении. Кроме того, в альвеоцитах II типа Na^+-H^+ -обменник локализован в основном на базолатеральной стороне клетки и, вероятно, не может вносить большой вклад в трансэпителиальный транспорт Na^+ [34]. Дополнительно к выше-названным системам были получены доказательства о наличии в альвеоцитах II типа Na^+ -амино [6,8], Na^+ -фосфат [8] и $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ [22] котранспортеров.

Более того, существование некоторых дополнительных Na^+ и K^+ транспортирующих путей было продемонстрировано преимущественно для свежевыделенных альвеоцитов II типа. Присутствие Na^+ -зависимого транспорта аналогов глюкозы было обнаружено для свежевыделенных альвеоцитов морской свинки [16] и для культуры клеток альвеоцитов II типа крысы [18]. Глюкозозависимый транспорт Na^+ наблюдали в суспензии везикул, полученных из апикальной мембраны легких быка [32]. Исследования с использованием буметанида, специфического ингибитора $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ -котранспорта [44], продемонстрировали наличие этого ион-транспортирующего пути в свежееизолированных альвеоцитах кролика, крысы и морской свинки [4,17]. *Kemp et al.* также описали K^+-H^+ АТФазу для свежееизолированных альвеоцитов морской свинки [17].

Было обнаружено, что флоретин, диполярное органическое соединение, способен изменять активность систем, транспортирующих Na^+ , K^+ и глюкозу, в различных типах эпителиальных клеток. Например, в почечном [28] и кишечном [19,20] эпителии обнаружили существование Na^+ -независимого переносчика глюкозы, высокочувствительного к флоретину. В MDCK [42] и HeLa [43] культивированных эпителиальных клеточных линиях флоретин ингибирует $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -котранспорт. В непигментированном [10] и пигментированном [15] мерцательном эпителии флоретин ингибирует симпорт Na^+ и аскорбата.

Кроме того, было показано, что флоретин подавляет активность Na^+/Li^+ (Na^+/Na^+)-обмена в эритроцитах [40].

Эксперименты, проведенные на изолированном перфузироваанном легком и *in situ* показали, что чувствительность альвеолярного эпителия к флоретину была значительно ниже, чем других типов эпителиальной ткани. Например, флоретин не влияет на скорость транспорта глюкозы в легкие кролика [39] и не изменяет абсорбцию жидкости в легких крысы [2,3]. Только для свежевыделенных альвеоцитов II типа морской свинки был отмечен незначительный эффект 1 ммоль флоретина на Na^+ -независимый транспорт глюкозы [16].

В представленной работе мы исследовали эффект флоретина на Na^+ и K^+ -транспорт в культивированном монослое альвеоцитов II типа. Нам удалось обнаружить, что флоретин сокращает Na^+ - и K^+ -вход намного сильнее, чем другие хорошо изученные к настоящему

времени ингибиторы систем транспорта Na^+ и K^+ . Наши результаты подтверждают, что ингибирование Na^+ и K^+ -транспорта вызывается посредством снижения в присутствии флоретина содержания внутриклеточного АТФ.

Материалы и методы

Материалы и экспериментальные растворы. Все использованные реагенты, за исключением специально отмеченных, были производства фирмы "Sigma". Радиоизотопы были получены от *Amersham Canada*. Среда А содержала (в mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 5 глюкоза, 20 Хепес (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-етансульфоновая кислота), pH доводили до 7,4 с помощью Трис(гидроксиметиламинометан). Флоретин и другие ингибиторы растворяли в ДМСО (диметилсульфооксид) ("Fisher Scientific", США) и присутствовали в среде в разведении 1:1000. Контрольная среда содержала процент ДМСО, аналогичный контрольному.

Выделение и культивирование клеток. Альвеоциты выделяли у взрослых самцов крыс линии *Sprague-Dawley* (175—250 г.), как описывалось ранее. Легкие анестезированных крыс отмывались от крови и затем обрабатывались в присутствии эластазы ("Worthington Biochemical", США) при 37°C в течение 30 мин. После этого ткань измельчали в присутствии ДНКазы (1 тип, "Boehringer Mannheim") и добавляли бычью сыворотку ("GIBCO", США) для того, чтобы остановить протеолиз. Клетки затем очищали на покрытых IgG пластиковых чашках [11]. Чистота выделения, которую определяли с помощью окрашивания посредством щелочной фосфатазы [12], была $87 \pm 5\%$. Жизнеспособность, которую определяли с помощью окрашивания трипановым-синим, была во всех случаях более 95%. Выделенные клетки высевали на пластиковые культуральные планшеты ("Corning", США) и поддерживали в среде Дульбекко в присутствии бычьей сыворотки и 40 мг/литр гентамицина при 37°C в атмосфере с содержанием 95% воздуха и 5% CO_2 . Клетки использовали в работе по истечении пятого дня, и день выделения принимался условно за первый день. Культуральную среду меняли через день. Ежедневно клетки проверялись на конfluэнтность с помощью фазово-контрастного микроскопа ("Nikon", Japan).

Регистрация входа Na^+ K^+ . Для регистрации накопления ионов Na^+ и K^+ мы использовали изотопы $^{22}\text{Na}^+$ и $^{86}\text{Rb}^+$. Клеточный монослой дважды промывали стандартным фосфатным буфером (pH 7,4) и преинкубировали в течение 30 минут при 37°C в среде А. В экспериментах по изучению входа Na^+ в альвеоциты в среду А добавляли убаин, чтобы подавить активность Na^+, K^+ -АТФазы и повысить внутриклеточный пул Na^+ . Далее клетки инкубировали в присутствии ингибиторов различных ион-транспортирующих систем, иногда убирая из среды инкубации глюкозу. Раствор затем заменяли на аналогичную среду с $^{22}\text{Na}^+$ или $^{86}\text{Rb}^+$. По окончании определенного срока инкубации вход изотопов останавливали добавлением холодной среды В, которая содержала (в mM): 100 MgCl_2 , 10

Хепес-трис (рН 7,4). Клетки затем лизировали в 1% растворе Na-додецилсульфата + 4mM EDTA, и радиоактивность клеточного лизата определяли в 5 мл в анализаторе *TriCarb 1600* (Packard Instrument, Downers Grove, США). Вход ионов подсчитывался, учитывая уровень внутриклеточной радиоактивности, внеклеточной специфической радиоактивности, содержания белка, и выражался в нмоль/мг белка.

Измерение уровня АТФ. Внутриклеточное содержание АТФ в альвеоцитах II типа определяли с помощью люциферин-люциферазного метода. Использовали метод, описанный ранее [21], но смоделированный для монослоев. Клетки промывали, преинкубировали и затем инкубировали в среде А в присутствии или отсутствии флоретина и в некоторых экспериментах в среде без глюкозы 5, 10, 15, 20 мин. Инкубацию останавливали добавлением и отмывкой холодным фосфатным буфером и холодным 0,5 М Трис-ацетатом (рН 7,4), и затем помещали немедленно на лед. Далее клетки быстро переводили во взвешенное состояние и обрабатывали 0,5% Тритон X-100. Суспензию встряхивали 10 с и центрифугировали при 3000 g 1 мин для удаления обломков плазматической клеточной мембраны. Световую эмиссию измеряли на люцинометре *BioOrbit* (Финляндия). Для этого 0,1 мл супернатанта смешивали с 0,05 мл экстракта, содержащего люциферин-люциферазу в 0,35 мл Трис-ацетат. Тест проводили дважды, и содержание АТФ определяли используя калибровочную кривую. Содержание АТФ в альвеоцитах выражали в нмоль АТФ на мг клеточного белка.

Определение выхода лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Содержание ЛДГ в среде инкубации определяли для оценки возможного повреждающего эффекта флоретина на плазматическую мембрану альвеоцитов. ЛДГ является свободновзвешенным цитоплазматическим белком, и его выход является своеобразным сигналом о повреждении мембраны [27]. Монослой клеток промывали, преинкубировали и инкубировали в присутствии и отсутствии флоретина 20 мин, как описано выше. После инкубации 0,1 мл среды инкубации использовали для анализа. В некоторых определениях монослой обрабатывали Тритон X-100, вызывая таким образом полное повреждение клеток и 100% выход ЛДГ из альвеоцитов. Данные были представлены как процент выхода ЛДГ после инкубации с различными концентрациями флоретина от выхода ЛДГ из Тритон-обработанных клеток.

Результаты

Вход Na^+ и K^+ . На рис.1 представлена кинетика входа Na^+ ($^{22}\text{Na}^+$) и K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) в культивируемый монослой альвеоцитов II типа. Очевидно, что вход K^+ остается линейным в течение первых 15 мин и нарастает к 30-й мин. Первоначальная скорость входа $^{86}\text{Rb}^+$ для первых 15 мин, т.е. на линейном участке, равна $2,4 \pm 0,2$ нмоль/мг белка $\cdot \text{мин}^{-1}$ ($n=8$). Вход Na^+ в присутствии убаина сохранял линейность первые 5 мин, увеличивался первые 10 мин и сохранял устойчивое равновесие вплоть до 40 мин. Первоначальная

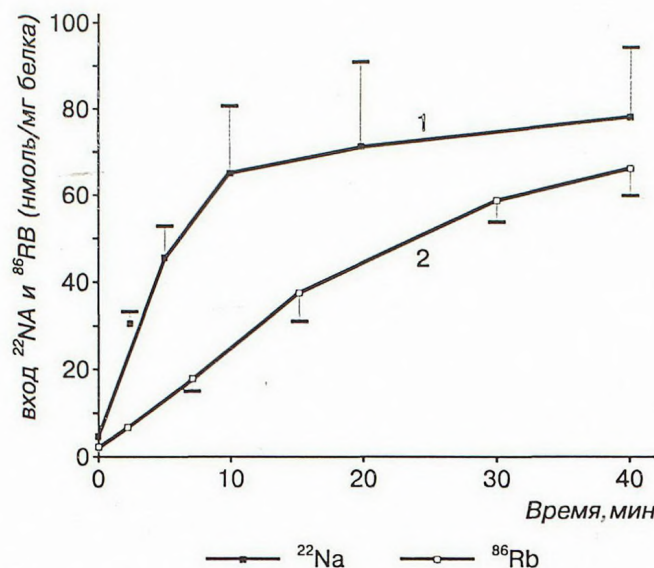


Рис.1. Кинетика входа ^{22}Na и ^{86}Rb в альвеоциты II типа. Вход ^{22}Na оценивался в присутствии 1 мМ убаина. Представлены средние значения $\pm \text{SE}$ в каждой временной точке выхода ^{22}Na ($n=12$ монослоев) и входа ^{86}Rb ($n=6$).

скорость входа $^{22}\text{Na}^+$, определенная для первых 5 мин, была $8,9 \pm 0,5$ нмоль/мг белка $\cdot \text{мин}^{-1}$ ($n=4$). Учитывая эти данные, накопление Na^+ в альвеоцитах регистрировали в течение первых 5 мин, а вход K^+ — первых 15 мин.

На рис.2 сравнивается эффект различных концентраций флоретина, амилорида, бензамилла или этилизпропиламилорида (EIPA). Видно, что флоретин в концентрации 10 мкМ не модифицирует вход Na . Используя данные представленные в табл.1, можно сделать вывод, что вход Na в альвеоциты является более чувствительным при 10 мкМ концентрации ингибитора к EIPA по сравнению с амилоридом или с бензамиллом. Однако в области от 60 до 250 мкМ

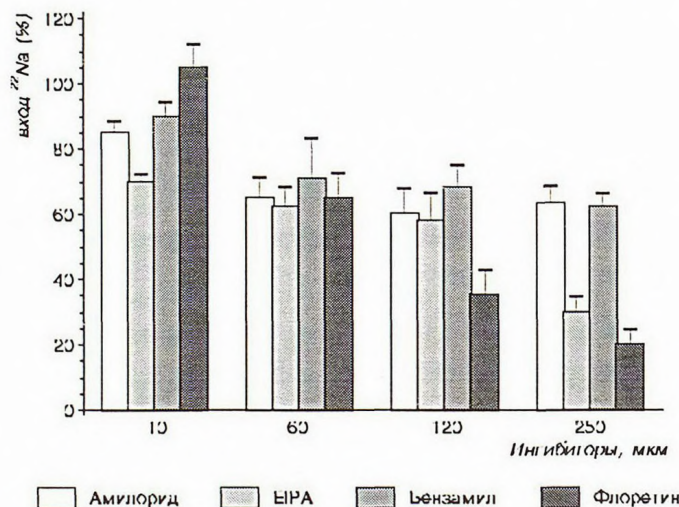


Рис.2. ^{22}Na в альвеоциты II типа в присутствии флоретина, амилорида, бензамилла и EIPA. Значения определялись через 5 мин после инкубации с ^{22}Na . Данные выражены как процент от контрольных значений ($38,1 \pm 1,9$ нмоль/мг белка, $n=17$ монослоев) в отсутствие ингибиторов. Представлены средние значения $\pm \text{SE}$; $n \geq 5$ для каждой концентрации препаратов.

Таблица 1

Вход $^{22}\text{Na}^+$ в альвеоциты II типа в присутствии амилорида и его структурных аналогов (бензамил, EIPA)

	Вход $^{22}\text{Na}^+$, нмоль/мг белка/5 мин
Контроль	38,4±1,2
+10 мкМ амилорид	30,2±1,8
+10 мкМ бензамил	29,8±1,6
10 мкМ EIPA	22,8±1,6

Примечание. В таблице представлены средние значения $\pm$ SE входа $^{22}\text{Na}^+$ в альвеоциты II типа в отсутствие (контроль, $n=44$ монослоев) или в присутствии: амилорида ($n=26$), бензамила ($n=14$), EIPA ($n=15$).

Флоретин становится более сильным ингибитором. Максимальное ингибирование (80% от контроля, $p<0,001$) регистрировали с 250 мкМ флоретина. Значительное ингибирование входа Na (60% от контроля) также наблюдали в присутствии 250 мкМ EIPA. Отсутствие глюкозы в среде инкубации не повлияло на эффект флоретина (см. табл.2).

На рис.3 представлен ингибирующий эффект (70% от контроля) 1 мМ уабаина на вход K^+ . В присутствии уабаина 10 мкМ буметанида вызывает дальнейшее снижение входа K^+ . 250 мкМ концентрация флоретина подавляет вход K^+ вплоть до 90%. Дальнейшее добавление уабаина на фоне флоретина не вызывает дополнительного снижения входа K^+ .

Внутриклеточное содержание АТФ. Содержание АТФ в альвеоцитах II типа после 5 дней роста в культуре равняется $0,91 \pm 0,04$ нмоль/мг белка ($n=16$). Содержание внутриклеточной воды, определенное с помощью распределения ^{14}C -мочевины равняется $0,3 \pm 0,09$ мкл/мг белка ($n=16$). С учетом этих данных было высчитано, что внутриклеточная концентрация АТФ для культивированных альвеоцитов II типа в контроле равна $3,04 \pm 0,15$ мМ.

Рис.4,А показывает, что флоретин ингибирует уровень АТФ в альвеоцитах и в доза-зависимой манере. Самый низкий уровень АТФ наблюдали в присутствии 250

Таблица 2

Влияние флоретина на поглощение $^{22}\text{Na}^+$ альвеоцитами II типа в присутствии или отсутствии глюкозы

	$^{22}\text{Na}^+$ поглощение, нмоль/мг белка/5 мин
Контроль (5 мМ глюкозы)	31,3±3,4
+250 мкМ флоретина	11,1±1,1*
без глюкозы	37,6±1,2
без глюкозы + 250 мкМ флоретина	12,8±2,4*

Примечание. Средние значения $\pm$ SE, $n \geq 4$ монослоям;
* — $p < 0,001$

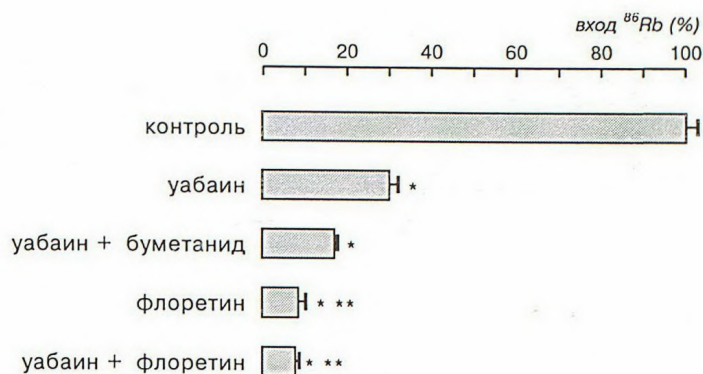


Рис.3. Вход ^{86}Rb в альвеоциты II типа в отсутствие или присутствии флоретина (250 мкМ), уабаина (1 мМ) или в композиции уабаина с флоретином или с буметанидом (10 мкМ). Данные выражены как процент от контрольных значений ($37,1 \pm 1,1$ нмоль/мг белка, $n=18$ монослоев) в отсутствие ингибиторов. Представлены средние значения $\pm$ SE; $n > 5$. * — $p < 0,0001$; + — $p < 0,05$.

мкМ флоретина. На рис.4,Б видно, что эффект флоретина развивался во времени. Самый низкий уровень АТФ наблюдался после 20 мин инкубации альвеоцитов с 250 мкМ флоретина. Отсутствие глюкозы в среде инкубации не повлияло на эффект флоретина 120 мкМ на внутриклеточное содержание АТФ (табл.3).

Уровень ЛДГ. Учитывая, что ингибирование входа Na^+ и K^+ так же, как и снижение уровня внутриклеточного АТФ в альвеоцитах, может быть связано просто с повреждением плазматической мембраны, мы исследовали уровень выхода ЛДГ из клеток в присутствии различных концентраций флоретина. Данные представлены в табл.4. Видно, что флоретин не изменяет выход ЛДГ из альвеоцитов вплоть до 250 мкМ концентрации.

Обсуждение

Данные, представленные в работе, демонстрируют, что флоретин является более сильным ингибитором транспорта моновалентных катионов по сравнению со всеми ранее известными ингибиторами ионтранспортующих систем для Na и K .

Последние несколько лет все более признанным становится гипотеза, что Na транспортируется через альвеолярный эпителий, как минимум через две популяции Na -каналов [24,25]. Фармакологически эти две популяции подразделяются с учетом чувствительности к амилориду и его структурных аналогов. Первая популяция (названная Н-тип) имеет высокую чувствительность к амилориду или бензамилу и намного более низкую чувствительность к EIPA. Исследования с использованием монослоя эмбриональных эпителиальных клеток, помещенных в камере Уссинга, продемонстрировали, что амилорид или бензамил ингибируют -40—70% коротких циркулирующих токов (Isc) в субмикромольных концентрациях, в то время как диметиламилорид (вещество, структурно близкое к EIPA) не проявляет эффекта вплоть до 100 мкМ [30]. Вторая популяция (L-тип) менее чувствительна к амилориду или бензамилу, чем к EIPA. В нашем исследовании EIPA был более сильным ингибитором

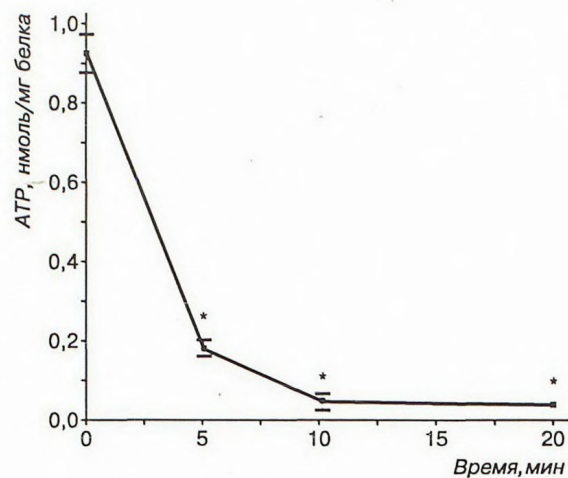
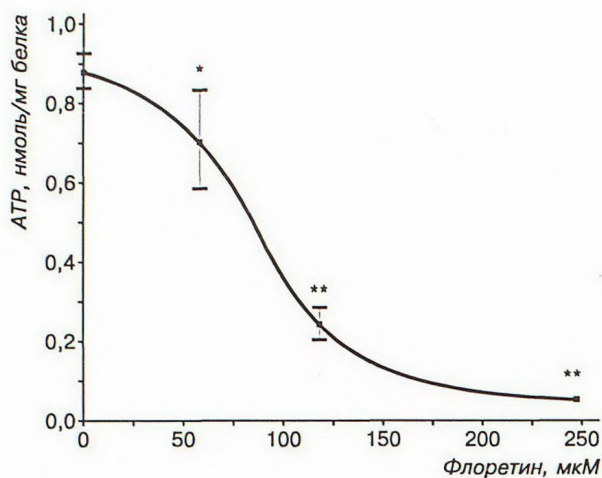


Рис.4. Влияние флоретина на концентрацию внутриклеточного АТФ. А — кривая доза-зависимой концентрации внутриклеточной АТФ от концентрации флоретина. Значения были получены через 10 мин после добавления флоретина, как описано в разделе "Методы". Представлены средние значения $\pm$ SE; $n \geq 4$. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,0001$. Б — влияние флоретина (250 мкМ) на содержание внутриклеточного АТФ. Представлены средние значения $\pm$ SE; $n \geq 4$. * — $p < 0,0001$.

для входа Na по сравнению с амилоридом или бензамиллом (см.табл.1). Эти данные показывают, что в нашем случае транспорт Na через плазматическую мембрану альвеоцитов осуществляется через каналы L-типа. Наши данные согласуются с данными *Matalon et al.* для культивируемых эмбриональных альвеоцитов II типа [24] и мембранных везикул, изолированных из зрелых клеток [25]. Однако имеются данные, которые вступают в противоречие с нашими данными и данными *Matalon. Russo et al.* [33] обнаружили, что вход Na в культивированные альвеоциты II типа в тех же экспериментальных условиях был более чувствительным к амилориду или бензамиллу и не изменялся в присутствии диметиламилорида. По нашему мнению, различия могут быть вызваны присутствием дексаметазона в культуральной среде и применением другого типа сыворотки.

Добавление флоретина, в отличие от амилорида или его аналогов, приводит к прогрессивному ингибированию входа Na в области от 10 до 250 мкМ вплоть до 80% (см. рис.2). Эффект флоретина на транспорт Na может быть связан не только с блокированием

Na-каналов, но также и с ингибированием Na-H-антипорта, Na-R-²Cl-котранспорта, Na-глюкоза-котранспорта и Na-Na-обмена. Первые две названные ионотранспортирующие системы уже идентифицированы в альвеоцитах II типа [7,17]. Однако известно, что в отсутствие стимулирующих воздействий активность Na-H-обмена в альвеоцитах незначительна [7,29]. Более того, было показано, что флоретин не воздействует на эти ион-транспортирующие системы в эритроцитах [36]. Учитывая данные, представленные ниже, трудно представить вовлечение ингибирования Na-глюкоза-симпорт в процесс снижения входа Na в присутствии флоретина.

- 1) Отсутствие глюкозы в среде инкубации не изменяет уровень входа Na (см. табл.2, [33]).
- 2) Флоретин ингибирует вход Na одинаково и в присутствии, и в отсутствии глюкозы в среде инкубации (табл.2).

Мы не обнаружили значительного эффекта буметанида на вход Na в альвеоциты II типа (данные не представлены). Это соответствует результатам экспериментов *Russo et al.* [33]. Таким образом, можно

Т а б л и ц а 3

Влияние флоретина на содержание клеточного АТФ в присутствии или отсутствии глюкозы

	АТФ, нмоль/мг белка
Контроль (5 мМ глюкоза)	$1,01 \pm 0,09$
+120 мкМ флоретина	$0,22 \pm 0,03^*$
без глюкозы	$0,95 \pm 0,04$
без глюкозы + 120 мкМ флоретина	$0,23 \pm 0,06^*$

П р и м е ч а н и е. Данные были определены через 10 мин после добавления 120 мкМ флоретина, как описано в разделе "Методы". Средние значения $\pm$ SE, $n=5$ монослоев. * — $p < 0,001$.

Т а б л и ц а 4

Выход ЛДГ из альвеоцитов II типа в присутствии флоретина

	Выход ЛДГ, %
Контроль	$5,49 \pm 0,3$
Флоретин 60 мкМ	$3,89 \pm 0,2$
Флоретин 120 мкМ	$5,63 \pm 0,5$
Флоретин 250 мкМ	$7,55 \pm 1,4$
Клетки, обработанные Тритоном X-100	100

П р и м е ч а н и е. Данные оценивались в процентах по сравнению с высвободившейся ЛДГ из клеток после обработки Тритоном X-100 (0,5%). Средние значения $\pm$ SE, $n=4$ монослоев.

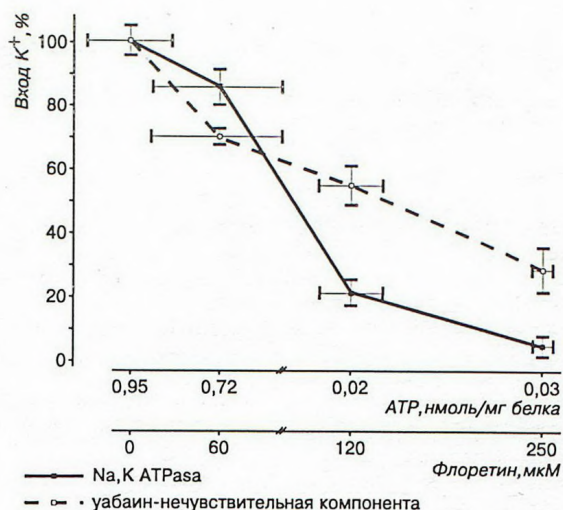


Рис. 5. Взаимоотношение между концентрацией АТР и активностью убаин-чувствительной убаин-нечувствительной компонентами по входу K^+ в альвеолы II типа в присутствии флоретина. Значения выражены как процент активности в условиях контроля ($24,6 \pm 3,3$ и $13,8 \pm 3,4$ нмоль/мг белка/15 мин для убаинчувствительной и убаин-нечувствительной компонент, соответственно) $\pm$ SE; $n > 6$.

сделать вывод, что ингибирование входа Na флоретином не связано с подавлением активности Na-K-Cl-котранспорта.

Kemp *et al.* недавно продемонстрировали, что вход K в альвеолы II типа связан с активностью Na-K-АТФазы (убаинчувствительной компоненты) и Na-K- ^{2}Cl -котранспорта (убаин-нечувствительной, буметанид-чувствительной компоненты). Наши результаты совпадают с этими наблюдениями. Однако интересно было обнаружить, что подобно выходу Na транспорт K также ингибировался флоретином в значительно большей степени, чем убаином, или даже убаин и буметанидом вместе взятыми (см. рис. 3).

Одним из возможных объяснений такого действия флоретина на транспорт Na и K могло быть повреждение плазматической мембраны альвеоцитов. Однако данные, представленные в табл. 4, демонстрируют, что выход ЛДГ в присутствии флоретина не отличается от контроля. С другой стороны, ингибирование ионного транспорта может быть связано с изменением клеточного метаболизма. Действительно, как показано на рис. 4, флоретин вызывает сокращение уровня АТФ в альвеоцитах в дозависимой манере. Снижение уровня АТФ было не зависимо от присутствия глюкозы в среде инкубации и, следовательно, не было связано с ингибированием флоретином Na-глюкоза контранспорта (см. табл. 3).

Было обнаружено, что флоретин способен проникать через липидный бислой [38]. Таким образом, можно предположить, что флоретин также способен проникать через митохондриальную мембрану и ингибировать окислительное фосфорилирование. Действительно, было обнаружено, что флоретин ингибирует NADH-зависимое окисление в субмитохондриальных частицах, выделенных из сердца быка, с константой полуингибирования 100 мкМ [9].

Известно, что АТФ взаимодействует с Na-K-АТФазой на каталитическом ($K_{0,5} \sim 1-2$ мМ) и регуляторном ($K_{0,5} \sim 50$ мкМ) сайтах [45]. Однако в регуляцию активности ионных переносчиков и каналов АТФ вовлекается через фосфорилирование [46], и сродство протеинкиназ к АТФ находится в пределах 10–15 мкМ. На рис. 5 видно, что при $[АТФ]_i \approx 0,8$ мМ активность Na-K-помпы и убаин-нечувствительной компоненты ингибировалась примерно на 80 и 40% соответственно. Эти результаты соответствуют данным по сродству к АТФ для Na-K-АТФазы и ионных переносчиков, представленных выше.

Представленные данные демонстрируют, что флоретин является неспецифическим ингибитором транспорта Na и K в альвеолы II типа. Можно сделать вывод, что эффект флоретина на ион-транспортирующие системы связан со снижением уровня внутриклеточного содержания АТФ в клетках.

Представленная работа была частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (Грант № 96-04-50232).

ЛИТЕРАТУРА

1. Basset G., Crone C., Saumon G. Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung // *J. Physiol. Lond.* — Vol. 384. — P. 311–324.
2. Basset G., Crone C., Saumon G. Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium // *Ibid.* — P. 325–345.
3. Basset G., Saumon G., Bouchonnet F., Crone C. Apical sodium transport in pulmonary epithelium in situ // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1988. — Vol. 942, № 1. — P. 11–18.
4. Bland R.D., Boyd C.A.R. Cation transport in lung epithelial cells derived from fetal, newborn and adult rabbits // *J. Appl. Physiol.* — 1986. — Vol. 61, № 2. — P. 507–515.
5. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
6. Brown S.E.S., Kim K.J., Goodman B.E., Wells J.R., Crandall E.D. Sodium-amino acid cotransport by type II alveolar epithelial cells // *J. Appl. Physiol.* — 1985. — Vol. 59. — P. 1616–1622.
7. Brown S.E.S., Heming T.A., Benedict C.R., Bidani A. ATP-sensitive Na⁺-H antiport in type II alveolar epithelial cells // *Am. J. Physiol.* — 1991. — Vol. 261. — P. C954–C963.
8. Clerici C., Soler P., Saumon G. Sodium dependent phosphate and alanine transport but sodium-independent hexose transport in type II alveolar epithelial cells in primary culture // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — Vol. 1063. — P. 27–35.
9. De Jonge P.C., Wieringa T., Van Putten J.P., Krans H.M., Van Dam K. Phloretin - an uncoupler and an inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation // *Ibid.* — 1983. — Vol. 772. — P. 219–225.
10. Delamere N., Coca-Prados M., Aggarwal S. Studies on regulation of the ascorbic acid transporter in a cell line derived from rabbit non-pigmented ciliary epithelium // *Ibid.* — 1993. — Vol. 1149. — P. 102–108.
11. Dobbs L.G., Gonzalez R., Williams M.C. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity // *Am. Rev. Respir. Dis.* — 1986. — Vol. 134. — P. 1268–1275.
12. Edelson J.D., Shannon J.M., Mason R.J. Alkaline phosphatase: a marker of alveolar type II cells differentiation // *Ibid.* — 1988. — Vol. 138. — P. 1268–1275.
13. Feng Z.-P., Clark R.B., Berthiaume Y. Identification of nonselective cation channels in cultured adult rat alveolar type II cells // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1993. — Vol. 9. — P. 248–254.
14. Fisher A.B., Furia L., Berman H. Metabolism of rat granular pneumocytes isolated in primary culture // *J. Appl. Physiol.* — 1980. — Vol. 49. — P. 743–750.

15. Helbig H., Korbmacher C., Wohlfarth J., Berweck S., Kuhner D., Wiederholt M. Electrogenic Na⁺-ascorbate cotransport in cultured bovine pigmented ciliary epithelial cells // *Am. J. Physiol.*—1989.— Vol.256.— P.C44—C49.
16. Kemp P.J., Boyd C.A. Pathways for glucose transport in type II pneumocytes freshly isolated from adult guinea pig lung // *Ibid.*—1992.— Vol.263.— P.L612—L616.
17. Kemp P.J., Roberts G.C., Boyd C.A.R. Identification and properties of pathways for K⁺ transport in guinea-pig and rat alveolar epithelial type II cells // *J. Physiol. Lond.*—1994.— Vol.476.— P.79—88.
18. Kerr J.S., Reicherter J., Fisher A.B. 2-Deoxy-D-glucose uptake by rat granular pneumocytes in primary culture // *Am. J. Physiol.*—1982.— Vol.243.— P.C14—C19.
19. Kimmich G.A., Randles J. A Na-independent, phloretin-sensitive monosaccharide transport system in isolated intestinal epithelial cells // *J. Membr. Biol.*—1975.— Vol.23. № 1.— P.57—76.
20. Kimmich G.A., Carter-Su C., Randles J. Energetic of Na-dependent, sugar transport by isolated intestinal epithelial cells: evidence for a major role for membrane potentials // *Am. J. Physiol.*—1977.— Vol.233, № 5.— P.E357—E362.
21. LaCagnin L.B., Bowman L., Ma J.Y.C., Miles P.R. Metabolic changes in alveolar type II cells after exposure to hydrogen peroxide // *Ibid.*—1990.— Vol.259.— P.L57—L65.
22. Lumban R.L., Crandall E.D. Na⁺-HCO₃ symport modulates intracellular pH in alveolar epithelial cells // *Ibid.*—1991.— Vol.260.— P.L555—L561.
23. Matalon S. Mechanism and regulation of ion transport in adult and mammalian alveolar type II pneumocytes // *Ibid.*—1991.— Vol.261. P.C727—C738.
24. Matalon S., Bauer M.L., Benos D.J., Kleymen T.R., Lin C., Cragoe E.J., O'Brodovich H. Fetal lung epithelial cells contain two populations of amiloride-sensitive Na channels // *Ibid.*—1993.— Vol.264.— P.L357—L364.
25. Matalon S., Bridges R., Benos D.J. Amiloride-inhabitable Na conductive pathways in alveolar type II pneumocytes // *Ibid.*—1991.— Vol.260.— P.L90—L96.
26. Matthay M.A., Berthiaume Y., Staub N.C. Long-term clearance of liquid and protein from the lung of unanesthetized sheep // *J. Appl. Physiol.*—1985.— Vol.59.— P.928—934.
27. Michell D.B., Santone K.S., Acosta D. Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage // *J. Tissue Culture Meth.*—1980.— Vol.6.— P.113—116.
28. Mullin J.M., Kofeldt L.M., Russo L.M., Hagee M.M., Dantzig A.H. Basolateral 3-O-methyl glucose transport by cultured kidney (LLC-PK1) epithelial cells // *Am. J. Physiol.*—1992.— Vol.262, № 3, Pt 2.— P.F480—F487.
29. Nord E.P., Brown S.E.S., Crandall E.D. Characterization of Na⁺-H⁺ antiport in type II alveolar epithelial cells // *Ibid.*—1987.— Vol.252.— P.C490—C498.
30. O'Brodovich H., Rafii B., Post M. Bioelectric properties of fetal alveolar epithelial monolayers // *Ibid.*—1990.— Vol.258.— P.L201—L206.
31. O'Brodovich H., Hannam V., Seear M., Mullen J.B.M. Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs // *J. Appl. Physiol.*—1990.— Vol.68.— P.1758—1762.
32. Oelberg D.G., Xuy F., Shabarek F. Sodium-coupled transport of glucose by plasma membranes of type II pneumocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*—1994.— Vol.1194.— P.92—98.
33. Russo R.M., Lubman R.L., Crandall E.D. Evidence for amiloride-sensitive sodium channels in alveolar epithelial cells // *Am. J. Physiol.*—1992.— Vol.262.— P.L405—L411.
34. Lubman R.L., Crandall E.D. Polarized distribution of Na⁺-H⁺ antiport activity in rat alveolar epithelial cells // *Ibid.*—1994.— Vol.266.— P.L138—L147.
35. Saumon G., Basset G. Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium // *J. Appl. Physiol.*—1993.— Vol.74, № 1.— P.1—15.
36. Grinstein S. et al. Mechanisms of regulation of Na-H exchanger // *J. Membr. Biol.*—1986.— Vol.90.— P.1—12.
37. Smedira N., Gates L., Hastings R., Jayr C., Sakuma T., Pittet J.F., Matthay M.A. Alveolar and lung liquid clearance in anesthetized rabbits // *J. Appl. Physiol.*—1991.— Vol.70.— P.1827—1835.
38. Verkman A.S., Solomon A.K. A stepwise mechanism for the permeation of phloretin through a lipid bilayer // *J. Gen. Physiol.*—1982.— Vol.80, № 4.— P.557—581.
39. Wangenstein D., Barlett M. D- and L-glucose transport across the pulmonary epithelium // *J. Appl. Physiol.*—1984.— Vol.57, № 6.— P.1722—1730.
40. Waters B., Thakar J., Lapiere Y. Erythrocyte lithium transport variables as a marker for manic-depressive // *Neuropsychobiology.*—1983.— Vol.9, № 2.— P.94—98.
41. Yue G., Shoemaker R.L., Matalon S. Regulation of low-amiloride-affinity sodium channels in alveolar type II cells // *Am. J. Physiol.*—1994.— Vol.267.— P.L94—L100.
42. Aiton J.F., Brown C.D., Ogden P., Simmons N.L. K⁺ transport in "tight" epithelial monolayers of MDCK cells // *J. Membr. Biol.*—1982.— Vol.65.— № 1—2.— P.99—109.
43. Aiton J.F., Chipperfield A.R., Lamp J.F., Ogden P., Simmons N.L. Occurrence of passive furosemide-sensitive transmembrane potassium transport in cultured cells // *Biochim. Biophys. Acta.*—1981.— Vol.646, № 3.— P.389—398.
44. O'Grady S.M., Palfrey H.C., Field M. Characteristics and functions of Na-K-2Cl cotransport in epithelial tissues // *Am. J. Physiol.*—1987.— Vol.253.— P.C177—C192.
45. Jorgensen P.L. Mechanism of the Na⁺-K⁺-pump. Protein structure and conformations of pure (Na⁺-K⁺)-ATPase // *Biochim. Biophys. Acta.*—1982.— Vol.694, № 1.— P.27—68.
46. Chipperfield A.R. The Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport system // *Clin. Sci.*—1986.— Vol.71, № 5.— P.465—476.

Поступила 22.06.96.