

К. В. КАЗАРЯН, С. М. МАРТИРОСОВ, А. С. ТИРАЯН

ПОТЕНЦИАЛ ПОКОЯ И НАТРИЕВЫЙ НАСОС ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Изучалась связь мембранного потенциала гладкомышечных клеток кольцевых мышц желудка лягушки с работой натриевого насоса. При безусловном наличии механизма активного транспорта ионов натрия из клеток гладкой мускулатуры не наблюдается прямого участия натриевого насоса в генерации потенциала покоя. Предполагается, что имеется непосредственная связь между видимой электронейтральностью помпы и слабовыраженной избирательностью мембран гладкомышечных клеток.

Гладкомышечная ткань обладает рядом особенностей, отличающих ее от других возбудимых образований. К характерным свойствам клеток гладкой мускулатуры относятся ритмические колебания величины потенциала покоя. Предполагается наличие прямой связи между этими колебаниями и натриевым насосом гладкомышечных клеток [9, 11, 17]. Представляет интерес выяснение природы потенциала покоя и медленных колебаний при исследовании механизма активного транспорта у гладкомышечных клеток.

Материал и методика. Эксперименты были проведены на кольцевых мышцах желудка лягушки, лишенных нервных клеток. Исследование мембранных потенциалов (МП) проводилось методом «сахарозного моста» [18]. Вырезанные мышечные полоски помещались в горизонтальную часть Т-образной трубки плексигласовой камеры. При этом средняя часть препарата омывалась изотоническим раствором сахарозы, в то время как один конец мышцы находился под током фонового раствора, а другой—омывался тестирующими растворами. МП регистрировались после установления «короткозамыкающего фактора» [6].

Экспериментальные растворы были приготовлены на основе раствора Рингера (мМ); 1. KCl—2,5; NaCl—115; CaCl₂—1,8; NaHCO₃—2,4. Тоничность растворов оставалась постоянной.

МП регистрировались с помощью хлорсеребряных электродов, введенных в солевые мосты (3М KCl на агаре). Электрическая цепь, предназначенная для отведения потенциалов, включала рН-метр типа ЛПУ-01 в качестве усилителя биопотенциалов и самопишущий электронный потенциометр типа ЭПП-09.

В целях ингибирования активного транспорта в некоторых экспериментах был применен оуабайн в концентрации 10^{-4} — 10^{-5} М.

Для обогащения мышечных полосок ионами натрия различных концентраций свежееотпрепарированные мышцы инкубировались в течение 24—48 час. в безкальиевом растворе Рингера при 1—2°.

Анализ внутриклеточных концентраций ионов натрия $[Na^+]_V$ и калия $[K^+]_V$ проводился методом пламеннофотометрического анализа на спектрофотометре типа Model III. Согласно Бошлеру и Лавин [7], при расчетах внутриклеточных концентраций ионов внеклеточные пространства принимались равными 34%. Концентрации ионов рассчитывались в миллимолях на килограмм внутриклеточной воды (мМ/кг вкв).

Результаты и обсуждение. Известно, что существенную информацию о характере работы натриевого насоса можно получить при стимулировании выталкивания ионов натрия из клетки увеличением $[Na^+]_в$, как это применяется для скелетных и нервных волокон, а также сердечной мускулатуры [5, 15, 16]. Использование же подобной процедуры для гладкомышечных клеток (ГМК) окажется более эффективным, поскольку в сравнении с другими волокнами они позволяют максимально увеличить внутриклеточную концентрацию ионов Na^+ [14].

После инкубации свежееотпрепарированных мышц в безкальиевом растворе Рингера при $0-2^\circ$ в течение 24 и 48 час. существенно возрастает $[Na^+]_в$ и уменьшается $[K^+]_в$ в зависимости от времени инкубации. Причем насыщение внутриклеточного содержимого ГМК ионами натрия происходит за более короткое время (почти 24 час.), чем у скелетных мышц [5].

При перенесении мышечных полосок с высокой внутриклеточной концентрацией ионов Na^+ в раствор, содержащий 10 мг-ион K^+ /л при $20-22^\circ$, наблюдается восстановление исходного внутриклеточного содержания ионов через 1,5 час. (рис. 1). Таким образом, условия опыта

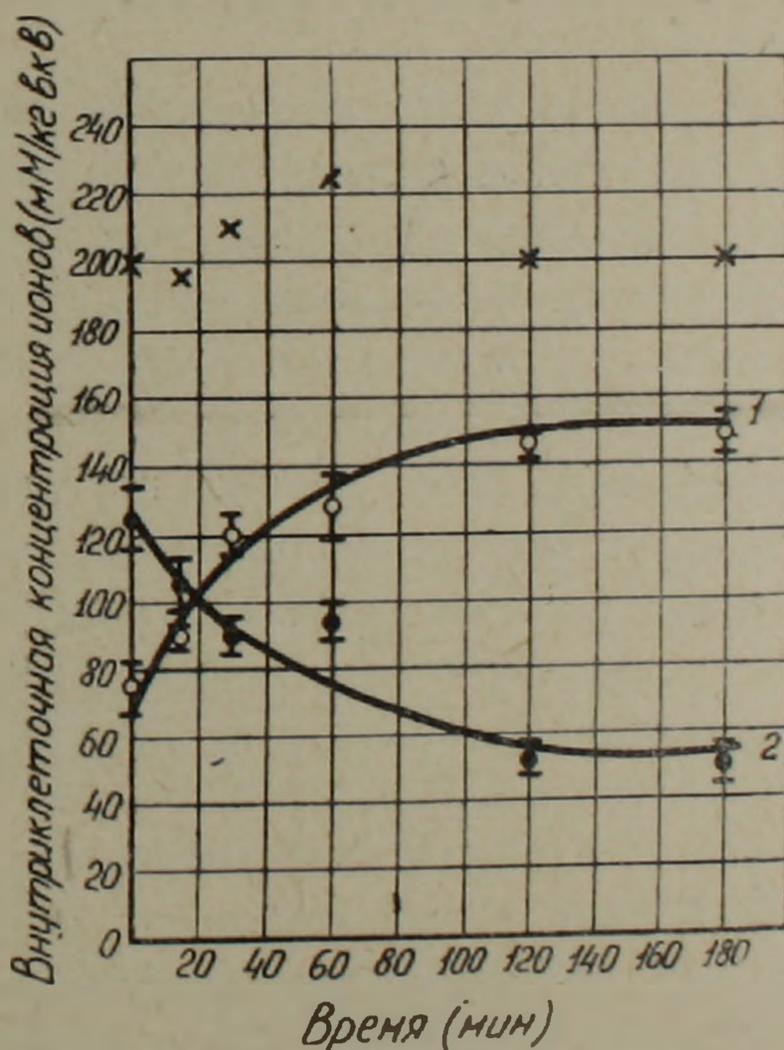


Рис. 1. Восстановление исходных внутриклеточных концентраций ионов K^+ и Na^+ при перенесении обогащенных ионами натрия мышц в раствор, содержащий 10 мг-ион K^+ /л. \circ — $[K^+]_в$; \bullet — $[Na^+]_в$; \times — $[K^+]_в + [Na^+]_в$. 1 — стандартные ошибки для концентраций 15 мышц.

для исследования транспорта ионов в период интенсивного их выталкивания из клеток оказались идентичными с таковыми при поперечнополосатых мышечных волокнах лягушки.

Установление роли ингибитора натрий-калиевого обмена (удаление ионов калия из внешней среды), низкой температуры и оубанна, яв-

ляющегося специфическим ингибитором натриевого транспорта из клеток, проводилось следующим образом. Мышечные полоски, предварительно обогащенные ионами натрия, переносились либо в безкальцевый раствор при комнатной температуре ($20-22^\circ$), либо в электролит, содержащий 2,5 мг-ион K^+ /л при $1-2^\circ$. Внутриклеточные концентрации ионов K^+ и Na^+ мышечных полосок, выдержанных соответственно 15, 30, 60, 120, 180 мин в указанных растворах, свидетельствуют о постоянстве $[Na^+]_в$ и $[K^+]_в$ во времени (рис. 2а, б). Подобные же результаты были получены при перенесении мышц в раствор с 10 мг-ион K^+ /л при $20-22^\circ$, содержащий $5 \cdot 10^{-5}$ М оубаина (рис. 2в).

Все указанные результаты служат доказательством наличия обычного натриевого насоса у гладкомышечных клеток желудка лягушки. В связи с этими возникает вопрос влияет ли натриевый насос на величину мембранного потенциала или он работает электронейтрально.

Как отмечалось, воздействие работы помпы на МП нагляднее проявляется при выведении из клетки избыточного количества ионов натрия. В результате наблюдается временная дополнительная поляризация мембраны, которая может быть устранена при действии низкой температуры, оубаина, а также удалением ионов калия из наружной среды [5, 13].

Попытки выявить дополнительную насосную поляризацию мембраны нами проводились различными способами. В первой серии экспериментов с применением свежепрепарированных мышечных полосок измерялась разность потенциалов при добавлении в тестирующий раствор оубаина. В этом случае не наблюдалось почти никаких изменений МП на концах мышечной полоски, и подобная картина устойчиво сохранялась в достаточно длительный период записи потенциалов (40—45 мин). В качестве ингибитора активного транспорта ионов натрия на свежепрепарированных мышцах использовалась низкая температура ($1-2^\circ$). С этой целью после установления фактора «короткого замыкания» тестирующий раствор сменялся на электролит того же состава, охлажденный до $0-2^\circ$, а температура фонового не изменялась. При подобной постановке опыта зарегистрированная разность потенциалов оказалась равной $4,0 \pm 1,2$ мв (таблица).

Для анализа полученного результата необходимо учесть разность диффузионных потенциалов, которая, наряду с короткозамыкающим фактором, является также артефактом метода «сахарозного моста» [6]. В данном случае ввиду идентичности составов электролитов на концах мышечной полоски она обусловлена лишь понижением температуры тестирующего раствора. Принимая во внимание совпадение по своим знакам полученного небольшого изменения потенциалов и ожидаемой при этом разности диффузионных потенциалов, фиксируемую нами величину можно приписать жидкостным пограничным потенциалам, что свидетельствует об электронейтральной работе насоса.

Были использованы также мышцы с высоким внутриклеточным содержанием натрия. Для установления фактора «короткого замыкания»

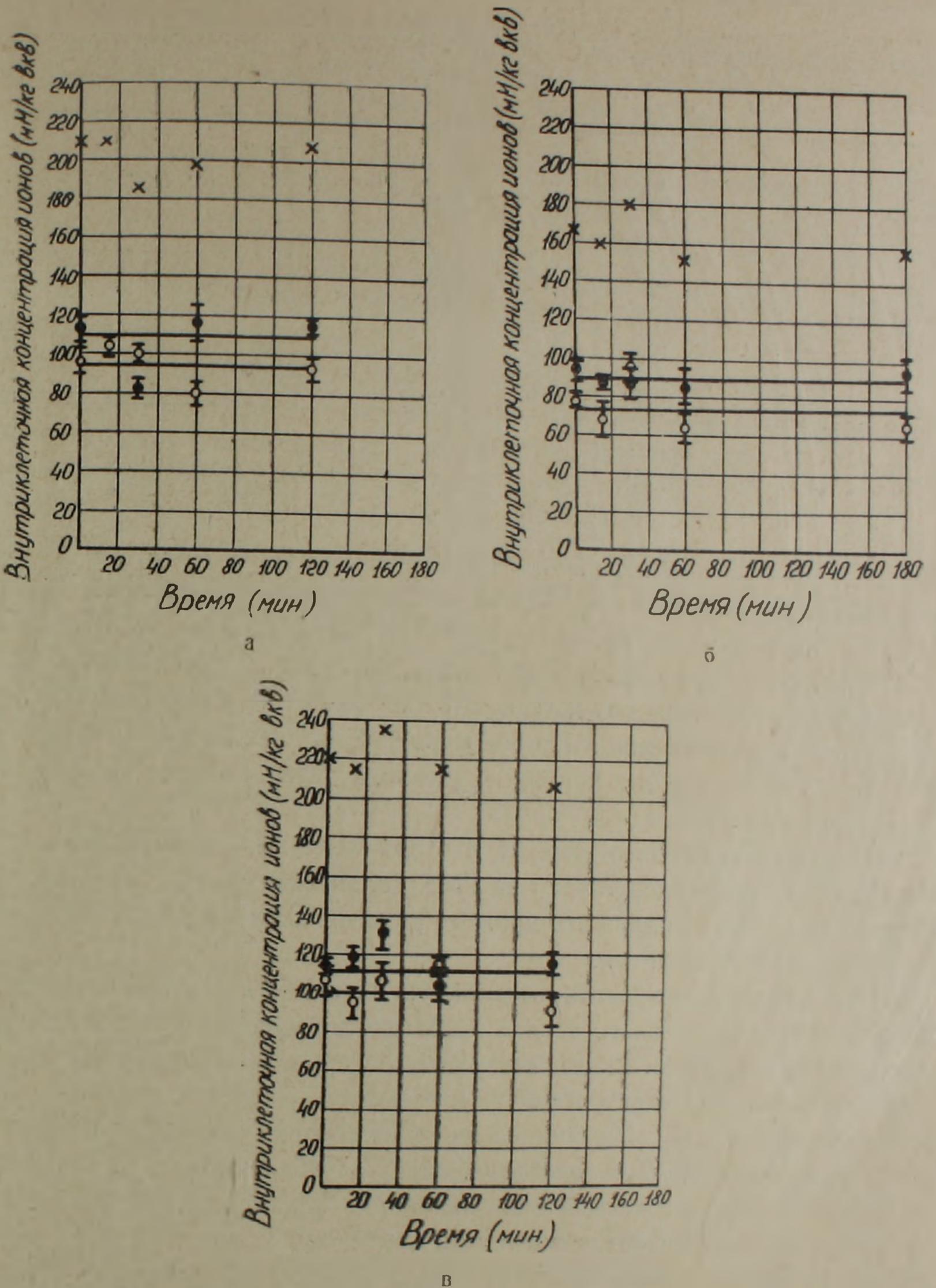


Рис. 2. Внутриклеточные концентрации ионов K^+ и Na^+ , обогащенных ионами натрия мышц в зависимости от времени выдерживания в растворах: а. безкальневый раствор при 20–22°; б. раствор, содержащий 2,5 мг-ион K^+ /л при 1–2°; в. раствор, содержащий 10 мг-ион K^+ /л и оуабин при 20–22°. \circ — $[K^+]_в$; \bullet — $[Na^+]_в$; \times — $[K^+]_в + [Na^+]_в$. I — стандартные ошибки концентраций для 10 мышц.

через «фонный» и «тестирующий» каналы камеры пропускался не рингеровский, а безкальневый раствор, чтобы обеспечить сохранение большой величины $[Na^+]$ к моменту начала измерений. Затем в качестве

Таблица

Разность мембранных потенциалов свежепрепарированных и обогащенных ионами натрия мышц при наличии в тестирующем растворе оуабайна и в условии низкой температуры (0—2°)

Время проинкубации в безкалевом растворе, час.	Внутриклеточные концентрации ионов, м.М/кг вкв		Температура фонового раствора, °С	Температура тестирующего раствора, °С	Концентрация ионов в фоновом растворе, мг-ион/л	Концентрация ионов в тестирующем растворе, мг-ион/л	Измеряемая разность потенциалов, мВ	Число измерений
	K ⁺	Na ⁺						
0	140	70	20—22	20—22	10	10 + оуабайн	0,0 ± 1,0	15
0	140	70	20—22	0—2	2,5	2,5	4,0 ± 1,2	13
48	78	138	20—22	20—22	10	10 + оуабайн	2,5 ± 1,5	15

фонового был взят электролит, содержащий 10 мг-ион K⁺/л, а тестирующим — раствор того же состава, но с добавлением оуабайна. Опять-таки не наблюдалось изменений разности потенциалов (таблица). Но т. к. разность диффузионных потенциалов равна нулю, можно констатировать отсутствие изменений МП во времени. Следовательно, не наблюдается уменьшения МП по мере выхода ионов Na⁺ из клетки, что обычно имеет место в подобных условиях при работе насоса электрогенного типа.

Из вышесказанного следует, что при наличии значительного активного транспорта ионов Na⁺ из ГМК кольцевых мышц желудка лягушки не удалось обнаружить прямого участия натриевого насоса в генерации потенциала покая.

При попытке объяснить медленную активность гладкой мышцы с помощью метаболического насоса необходимо выяснить влияние его работы на величину МП. Рядом авторов были проведены обширные эксперименты в поисках электрогенного натриевого насоса у гладкомышечных клеток [8, 10, 12—14], способного генерировать такие же значительные по величине ЭДС на мембране, как это наблюдалось на нервных и поперечнополосатых мышечных волокнах. Однако результаты таких экспериментов в близких условиях на *taenia coli* морской свинки показали, в одном случае, электрогенность натриевого насоса [13, 14], а в другом — электронейтральность [8]. Это свидетельствует о том, что электрогенность насоса у ГМК выражена слабо. Как известно, при наличии насосного тока, проходящего через мембрану [3, 19], генерируется разность потенциалов. Причины его возникновения целесообразно обсудить, основываясь на обобщенном уравнении МП [1, 4], в котором учтено противогradientное движение ионов Na⁺ и K⁺ с помощью переносчиков:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_H + P_{Na}/P_K [Na^+]_H}{[K^+]_B + \lambda [Na^+]_B},$$

где $\lambda = P_x/P_k$ — коэффициент электрической генерации, учитывающий вклад электрогенного натриевого насоса в величину МП; P_x и $P_k P_{Na}$ — коэффициенты проницаемости мембраны соответственно для комплекса (переносчик с Na^+) ионов K^+ и Na^+ .

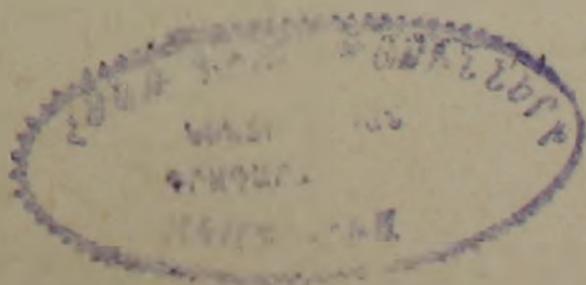
Согласно модели, рассматриваемой при выводе данного уравнения, на каждый выносимый заряд иона Na^+ по пассивному каналу диффузии в клетку поступают K^+ или Na^+ . Необходимо при этом заметить, что компенсирующим ионом может быть и анион, выходящий из клетки в наружную среду. Такая ситуация вероятнее у клеток с высокой внутриклеточной концентрацией Cl^- , например, у эритроцитов или ГМК. Работа насоса в простейшем случае электронейтральна при эквивалентном переносе ионов Na^+ и K^+ через транспортную систему натриевого канала, например, в отношении 1:1. Иная картина наблюдается при неэквивалентном транспорте катионов ($Na^+ : K^+ = 3:2$). В этом случае, наряду с электрогенной работой натриевого насоса, не исключается и возможность «видимой» электронейтральности. Действительно, при $\lambda < 1$ мы имеем как бы канал утечки и невозможно получить заметные величины потенциала, обусловленного работой насоса. В случае же $\lambda \gg 1$, слагаемое $\lambda \cdot [Na^+]_в$ становится весьма заметным, в особенности при высоких $[Na^+]_в$. Тогда, естественно, возникает гиперполяризация мембраны, которая увеличивается с повышением сопротивления канала утечки [5].

Исходя из вышеизложенного, под термином «электронейтральный» нами понимается именно отсутствие гиперполяризации мембраны при неэквивалентном интенсивном переносе ионов натрия и калия вследствие значительного компенсирующего канала утечки. Тогда работа натриевого насоса ГМК с присущими ему малоизбирательными мембранами [2], а также достаточно высокой внутриклеточной концентрацией Cl^- выглядит электронейтральной.

Все это свидетельствует о достаточно сложном участии натриевого насоса в ионных процессах у ГМК. Результаты, полученные в данной работе, выявляют некоторые аспекты поведения натриевого насоса при обычно применяемых экспериментальных условиях (безкальциевая среда, оубаин, низкая температура). Во всех этих случаях указанный насос ГМК желудка лягушки производит ионный обмен подобно насосу поперечнополосатых мышечных волокон. Тем не менее в этом случае не обнаруживается никакой заметной ЭДС, обусловленной работой насоса. По-видимому, только при определенном количественном сочетании скорости активного переноса ионов Na^+ и сопротивления каналов утечки может наблюдаться насосная гиперполяризация мембраны.

Институт физиологии им. Л. А. Орбели
АН АрмССР

Поступило 23.XI 1973 г.



ՀԱՐԹ ՄԿԱՆԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՀԱՆԳՍՏԻ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼԸ ԵՎ
ՆԱՏՐԻՈՒՄԱԿԱՆ ՊՈՄՊԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է գորտի ստամոքսի հարթ մկանային բջիջների մեմբրանային պոտենցիալի և նատրիումական պոմպի աշխատանքի կապը:

Այդ նպատակով որոշվել են մկանային շերտերի ներբջջային և իոնների քանակը և գրանցվել են համապատասխան մեմբրանային պոտենցիալներ:

Ստացված արդյունքները բացահայտում են նատրիումական պոմպի վարքի որոշ դրույթներ փորձի սովորական պայմաններում՝ (կալիում իոնների բացակայություն, օուաբային, ցածր ջերմաստիճան): Նշված պայմաններում գորտի ստամոքսի պոմպը իր աշխատանքով նման է ընդլայնական-շերտավոր մկանաթելերի պոմպին: Չնայած դրան պոմպի աշխատանքով պայմանավորված որևէ նշմարելի էՇՈՒ չի հայտնաբերվել: Հստ երևույթին մեմբրանի պոմպային հիպերպոլյարիզացիա կդիտվի միայն Na^+ իոնների ակտիվ փոխադրման արագության և «հոսքի կանալների» դիմադրության քանակային որոշակի համադրման ժամանակ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амбарцумян Т. Г., Мартиросов С. М. ДАН АрмССР, 52, 1, 52—57, 1971.
2. Կազարյան Կ. Բ. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1973.
3. Костюк П. Г., Крышталь О. А., Пидопличко В. П. Биофизика мембран. Сб. материалов симпозиума, Каунас, 1971.
4. Мартиросов С. М., Микаелян Л. Г. Биофизика, 15, 104—112, 1970.
5. Adrian R. H. and Slayman C. L. J. Physiol, 184, 970—1014, 1966.
6. Bennett M. R., Burnstock G. J. Physiol, 183, 637—648, 1966.
7. Bozler E., Zavhe D. Am. J. Physiol, 195, 45—48, 1958.
8. Buck B. and Goodford P. I. J. Physiol, 183, 551—569, 1966.
9. Bülbring E. Arch. Ges. Physiol, Pflügers, 273, 1—17, 1961.
10. Bülbring E. Physiol Rev, 42, suppl. 5, 160—178, 1962.
11. Bülbring E., Lüllman H. J. Physiol, 136, 310—323, 1957.
12. Casteels R. J. Physiol, 205, 193—208, 1969.
13. Casteels R., Droogmans G. and Hendrickx H. J. Physiol, 217, 281—296, 1971.
14. Casteels R., Droogmans G. and Hendrickx H. J. Physiol, 217, 297—313, 1971.
15. Kerkut G. A. and Thomas R. C. Comp. Biochem. Physiol, 14, 167—183, 1965.
16. Page B. and Storm S. R. J. Gen. Physiol, 48, 957—972, 1965.
17. Schatzman H. I. and Ackermann H. Helv. Physiol et Pharmacol Acta, 19, 196—213, 1961.
18. Stampfli R. A. Experientia, 10, 508—509, 1954.
19. Thomas R. C. J. Physiol, 201, 495—514, 1969.