ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXI, 7, 1978

УДК 577.352.4

ОУАБАИН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПОТОКИ НАТРИЯ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН

На основании литературных данных об оуабаин-нечувствительных потоках натрия построена и рассчитана модель системы, осуществляющей этот транспорт. Получены качественные кривые, отражающие зависимость потоков натрия от внешней и внутриклеточной концентрации натрия и АТФ. Такой набор кривых позволит в дальнейшем путем сопоставления их с экспериментальными данными найти пути усовершенствования схемы с целью более точного описания процессов, лежащих в основе оуабаин-нечувствительного транспорта ионов.

Исследование противоградиентного переноса ионов представляет интерес для понимания механизма поддержания ионного гетерогенитета клетки. Известно, что за противоградиентный сопряженный транспорт ионов натрия и калия ответственен натриевый насос, представляющий собой АТФазу, активируемую ионами натрия и калия, потребляющий энергию гидролиза АТФ и угнетаемый специфическим ингибитором Na · K-АТФазы-оуабаином. Разработан ряд моделей, объясняющих пути работы оуабаин-чувствительного насоса [1—4]. По данным Гаррахана с соавторами [5], одна и та же система ответственна за оуабаин-чувствительные Na:K и Na:Na обмены, значимость каждого из которых зависит от отношения АТФ/АДФ·$P_н$ [6].

Помимо оуабаин-чувствительного Na:Na обмена, существует и оуабаин-нечувствительный Na:Na обмен, который подробно исследован на эритроцитах [7—15]. Впервые он был обнаружен на эритроцитах человека Любовицем и Виттемом [16]. В присутствии оуабаина выход ионов натрия против электрохимического градиента оказался значительно выше расчетного диффузионного потока. Для объяснения этого явления пришлось предположить существование переносчика. Относительно механизма оуабаин-нечувствительных потоков натрия есть две точки зрения, причем имеются доказательства как в пользу первой, так и второй гипотезы: оуабаин-нечувствительный Na:Na обмен представляет собой обменную диффузию [13]; оуабаин-нечувствительный выход ионов натрия осуществляется с затратой энергии помповым механизмом, который может существовать наряду с обменной диффузией [15, 17].

В пользу первой гипотезы свидетельствуют следующие данные. Оуабаин-нечувствительный выход ионов натрия зависит не только от внутриклеточной концентрации натрия $[Na]_{вн}$, но и от наружной $[Na]_н$

[17, 18]. Причем зависимости потоков натрия от внутриклеточной концентрации и от наружной подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен, это дает возможность считать, что ионы натрия обмениваются в отношении 1:1 [13]. Наблюдается строгий параллелизм между изменением входа и выхода ионов натрия под действием ингибиторов SH-групп, а также при изменении температуры и pH среды [12, 13]. Однако эти потоки нечувствительны к изменению концентрации АТФ, что указывает на независимость их от источников энергии [13]. Все данные находятся в хорошем соответствии с основными критериями обменной диффузии, постулированными Юсингом [19]:

ионы проходят через мембрану в комплексе с переносчиком без траты энергии;

постоянная скорости транслокации комплекса одинакова в противоположных направлениях;

наблюдается строгий параллелизм между изменением входа и выхода ионов при изменении внутренней и внешней концентрации ионов;

ингибирование одного потока вызывает равной величины ингибирование противоположного потока;

кривая активации этого процесса подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.

В настоящее время имеются данные, указывающие на возможность существования наряду с механизмом обменной диффузии механизма оуабаин-нечувствительного активного транспорта (помпа II), работающего при низких концентрациях $Na_в$ или в безнатриевых растворах.

Так Саксом [15] было показано, что в безнатриевом растворе в оуабаине имеется выход ионов натрия, который тормозится фуросемидом, но растет при повышении наружной концентрации натрия. По данным Реттори [14], этакриновая кислота уменьшает оуабаин-нечувствительный выход ионов натрия как в присутствии, так и в отсутствие наружного натрия, не оказывая влияния на его вход.

Механизм, вызывающий оуабаин-нечувствительные потоки натрия, может быть либо полностью отличным от механизма, совершающего оуабаин-чувствительные Na:K и Na:Na обмены, либо все эти обмены могут быть функциями одной и той же системы, но с различными свойствами при разных условиях. В пользу последнего предположения есть два аргумента: фуросемид ингибирует не только оуабаин-нечувствительные, но и оуабаин-чувствительные потоки натрия, имеющие место в бескалиевой среде и являющиеся свойствами Na:K насоса [15]. Следовательно, если указанные движения ионов натрия являются свойствами не одной системы, а двух независимых систем, то можно сделать вывод, что фуросемид одинаково ингибирует обе системы; зависимость действия фуросемида на скорость выхода ионов натрия от концентрации $Na_в$ и оуабаина показывает, что если бы оуабаин-чувствительный и оуабаин-нечувствительный выходы ионов натрия совершались двумя механизмами, следовало бы предположить одинаковое

сродство обоих механизмов к наружному калию и оуабаину. Естественнее предположить наличие одного и того же механизма [15].

Относительно источников энергии для оуабаин-нечувствительных потоков Na мало данных, хотя известно, что они могут быть отличными от АТФ. Так, используя реконструированные тени эритроцитов, Аскари и Рао [20] показали, что тени, изолированные и инкубированные в присутствии инозина, способны проявлять оуабаин-нечувствительный выход ионов натрия, как и в присутствии АТФ.

Несмотря на многочисленные данные относительно оуабаин-нечувствительных потоков натрия, до сих пор не было сделано попытки построить модель, отражающую пути, по которым осуществляется оуабаин-нечувствительный транспорт ионов. В основу предлагаемой модели положена идея о том, что одна и та же система осуществляет как оуабаин-нечувствительный Na:Na обмен, так и оуабаин-нечувствительный активный вынос натрия. Источником энергии выбран АТФ, хотя им может быть какой-либо другой макроэрг [20]. При построении модели мы пользовались 3 основными постулатами [1], сформулированными на основе известных экспериментальных данных:

а) переносчиком ионов в мембране является мембранная АТФаза, которая при различных условиях может работать, как Na+K-АТФаза, или Na-АТФаза [3];

б) ферментно-субстратный комплекс переходит от внутренней границы мембраны к наружной в фосфорилированной форме [2, 3];

в) на наружной границе мембраны сродство переносчика к натрию меньше, чем на внутренней [2, 21].

В схеме (рис. 1) предполагается, что на переносчик E_1, представляющий собой мембранную АТФазу, садится ион натрия, затем к форме E_1Na присоединяется АТФ. Далее, в результате действия АТФазы происходит фосфорилирование фермента и комплекс $(E_1Na \sim P)$ АДФ переходит на наружную границу мембраны.

Если предположить, что сродство переносчика E_1 к натрию на наружной границе мембраны меньше, чем на внутренней [13], то у наружной границы мембраны этот комплекс отсоединит в среду ион натрия и перейдет в форму $(E'_2\text{-}P)$ АДФ. Предполагается, что большая часть энергии расходуется на этой стадии, где происходит также конформационный переход переносчика из формы E'_1 в форму E'_2. Комплекс $(E'_2\text{-}P)$ АДФ переходит от наружной границы мембраны к внутренней. Предположение о том, что АДФ отщепляется у наружной границы мембраны, а не у внутренней, содержит следующий смысл: во-первых, после отщепления АДФ образовалась бы форма $E'_2\text{-}P$, чувствительная к оуабаину, в то время как рассматриваемый механизм описывает оуабаин-нечувствительный обмен, и во-вторых, АТФаза отщепляла бы АДФ в клетку у внутренней границы мембраны так же, как и для системы натрий-калиевого насоса. У внутренней границы мембраны комплекс $(E'_2\text{-}P)$ АДФ освобождает АДФ в клетку и к форме $E'_2\text{-}P$ прис-

единяется ион калия, что облегчает дефосфорилирование комплекса E'_2-P [2]. Далее, после отщепления неорганического фосфата в клетке образуется комплекс E_2K, который способен отсоединить ион калия, что приводит комплекс в первоначальную форму E, и на этом транспортный цикл завершается.

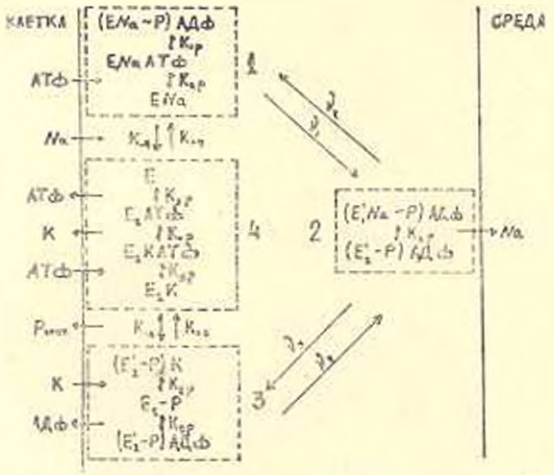

Рис. 1. Модель оуабаин-нечувствительного транспорта ионов натрия. Принимается, что состояния, взятые в пунктирные прямоугольники, находятся в равновесии. Все константы равновесия обозначаются через k_{lp}, константы скорости переходов от одной границы к другой— ν_i, константы переходов у внутренней границы мембраны, направленные по часовой стрелке—через k_{-l}, против часовой стрелки— k_{-p}

С возрастанием наружной концентрации ионов натрия равновесие в состоянии 2 может сдвинуться, и вероятность присоединения наружного иона натрия увеличивается, что приводит к Na:Na обмену по пути 1—2→1 без затраты энергии, т. е. по типу обменной диффузии.

Таким образом, предлагаемая система может одновременно работать и как помповый механизм и как механизм обменной диффузии, но значимость каждого из них зависит от концентрации ионов натрия в наружной среде (при низких концентрациях $Na_н$-помповый механизм и при высоких—обменная диффузия).

Выходящий поток ионов натрия для этой схемы рассчитывался с помощью диаграммного метода Хилла [22]. Расчет показал, что этот поток равен:

$$J_{Na_{вых}} = \frac{E_1}{D}\nu_1\theta_6(\nu_2\nu_3\theta_7\theta_8(k_{-6p}\theta_2 + k_{+6p}\theta_1 Na_{вн}) + k_{+6p}\nu_3\theta_7\theta_8(k_{+4p}Na_{вн}\theta_{10} + \nu_2\theta_1)),$$

где k_{lp} —константы равновесия, ν_i —константы перехода из одного состояния в другое, E_1 —полная концентрация переносчиков во всех формах, D—сумма всех направленных диаграмм, θ_i —доли концевых комплексов с переносчиком, расположенных в концах каждого равновес-

ного состояния. Необходимо иметь в виду, что в состоянии 1 имеются, помимо указанных, еще и комплексы ($ENa_н$—P) АДФ, $E_1 Na_н$АТФ, $ENa_н$, которые учитываются в расчете, однако опущены в схеме, чтобы не затруднять чтения модели. Они возникают из-за того, что те ионы натрия, которые пришли из наружной среды, не успевают еще обменяться с внутренними ионами натрия, так как этот обмен происходит на следующей ступени при переходе из состояния 1 в состояние 4.

Полученное выражение для выходящего потока натрия содержит как помповую, так и обменную компоненту, причем вклад каждой из этих компонент в $J_{Na\ вых}$ зависит от наружной концентрации натрия.

Таким образом, предложенная схема делает наглядной последовательность ступеней процесса, ведущего к оуабаин-нечувствительному транспорту и позволяет рассчитывать потоки натрия.

По полученным аналитическим выражениям потоков можно построить качественные кривые зависимости выхода ионов натрия от внутриклеточных концентраций ионов натрия и АТФ (рис. 2).

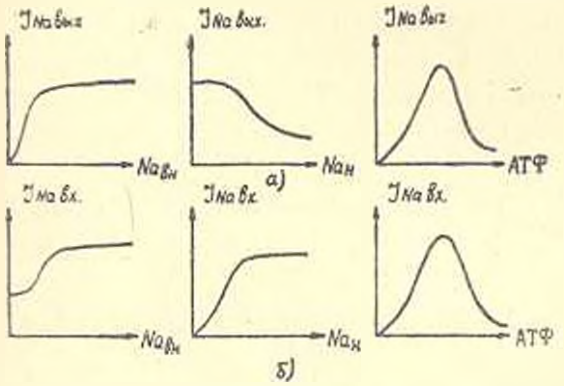

Рис. 2. Качественные кривые зависимости выходящего (а) и входящего (б) потоков натрия от $Na_в$ и $Na_н$ и АТФ.

Смысл такого рода построения в том, чтобы предсказать результаты будущих экспериментов. Ясно, что такой набор кривых зависимостей потоков от концентраций позволит в дальнейшем, путем их сопоставления с экспериментальными результатами, найти пути совершенствования схемы с целью более точного описания процессов, лежащих в основе оуабаин-нечувствительного транспорта ионов.

Отметим, что все сказанное относилось к эритроцитам, и предложенную схему нельзя механически переносить на мышцы и аксоны, так как несмотря на некоторые общие черты между этими тремя тканями имеются и существенные различия. Например, оуабаин-нечувствительный выход натрия нечувствителен к $K_н$ в мышцах [23] и эритроцитах [5], но чувствителен к $K_н$ в аксонах [24]. Наибольшее различие между этими тканями проявляется при замене натрия на литий: в аксонах и на мышцах оуабаин-нечувствительный поток натрия растет [25], а в эритроцитах падает [5]. По-разному действуют двухвалент-

ные катионы на уабаин-нечувствительный поток натрия в аксонах, мышцах и эритроцитах [5, 16, 26—28].

Кроме того, морфологическое строение мышц,—ее компартментализация,—существенно отличает ее от эритроцитов и аксонов и затрудняет однозначную трактовку полученных результатов. Детальное изучение уабаин-нечувствительного транспорта натрия и установление локализации транспортной системы является одной из самых актуальных задач в настоящее время.

Ереванский физический институт ГКНАЭ

Поступило 28.11 1978 г.

ՆԱՏՐԻՈՒՄԻ ՕՈՒԱԲԱԻՆ-ՌԵԶԻՍՏԵՆՏԱՅԻՆ ՀՈՍՔԵՐԸ

Տ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ, Ս. Յա. ԱԴԱՄՅԱՆ

Նատրիումի օուաբաին-ռեզիստենտային տրանսպորտին վերաբերող դրական տվյալների հիման վրա բերված և հաշված է համակարգի մոդելը, որն իրականացնում է այդ տրանսպորտը։ Առացված են որակական կորեր, որոնք արտացոլում են նատրիումի հոսքերի կախվածությունը նատրիումի և ԱՏՖ-ի կոնցենտրացիաներից։ Սրանց առկայությունը հնարավորություն կտա հետագայում փորձնական տվյալների հետ համադրման ճանապարհով գտնել սխեմայի կատարելագործման ուղիները, իոնների օուաբաին-ռեզիստենտային տրանսպորտի հիմքում ընկած պրոցեսները ավելի ճշգրիտ նկարագրելու նպատակով։

OUABAIN — INSENSITIVE SODIUM FLUXES

T. G. HAMBARTSUMIAN, S. Ya. ADAMIAN

Based on the literature data the model of ouabain-insensitive sodium transport system has been given and calculated. Qualitative curves reflecting the dependence of sodium fluxes on Na_{in}, Na_{o} and ATP concentrations have been obtained. These curves will allow, by comparison with the experimental results, to improve the scheme to give more precise description of the processes of ouabain-insensitive ion transport.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Амбарцумян Т. Г., Мартиросов С. М.* Биологический журнал Армении. *28*, 3, 102—103, 1975.
2. *Лишко В. К., Малышева М. К., Гревцирская Т. Н., Колчинская Л. Н.* Сб.: Биофизика мембран. 412—417, 1973.
3. *Post R. L. Hegyvary C., Kume S.* J. Biol. Chem. *25*, 1972.
4. *Stone A. J.* Biochem et Biophys. Acta. *150*, 578, 1968.
5. *Garrahan P. J., Glynn I. M.* J. Physiol., *192*, 159, 1967.
6. *De Weer P.* J. Physiol., *56*, 583, 1970.
7. *Beauge L. A.* Biochem et Biophys. Acta. *401*, 1, 95, 1975.

8. *Beauge L., A., Sjodin R. A.* J. Gen. Physiol. *52*, 3, 408, 1968.
9. *Dunn T. J.* J. Clin Sruest. *49*, 1804, 1970.
10. *Glynn J. M., Karlish S. J.* Sn: Energ. transp. in biol syst. (C. S. B. A.), 205, 1975.
11. *Lubowitz H.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *140*, 1, 153, 1972.
12. *Motais R., Sola F.* J. Physiol. *233*, 2, 423, 1973.
13. *Motais R.* J. Physiol. 233, 2, 395, 1973.
14. *Rettori O., Lenoir J.* J. Physiol. 222, 1, 880, 1972.
15. *Sachs J. R.* J. Gen. Physiol. *57*, 3, 259, 1971.
16. *Lubovits H., Whittam R.* J. Physiol. *202*, 1969.
17. *Hoffman J. F., Kregenow A.* Proc. N.—Y. Acad. Sci. *137*, 1966.
18. *Manery J. F., Dryden K. E., Still J. S.* Can. J. Phys. Pharm. *55*, 1977.
19 *Ussing H. H.* Acta. Scand. Physiol. *17*, 1, 1950.
20. *Askari A., Rao S. N.* Abstract. bioph. soc. 1968.
21. *Keynes R. D., Swan R. C.* J. Physiol. *147*, 591, 1959.
22. *Hill T. L.* J. Theor. biol. *10*, 442, 1966.
23. *Sjodin R. A., Beauge L. A.* J. Gen. Physiol. *61*, 2, 222, 1973.
24. *Baker P. F., Show T. G.* J. Physiol. *200*. 459, 1968.
25. *Keynes R. D.* J. Physiol. *178*, 305, 1965.
26. *Baker P. F., Hodgkin A., Meves H.* J. Physiol. *170*, 541, 1964.
27. *Keynes R. D., Steinheerdt R. A.* J. Physiol. *198*, 3, 581, 1968.
28. *Henderson E.* Pflüger. Arch. 1, 1976.