

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ N-ЭТИЛМАЛЕИНИМИДА НА УБАИН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПОТОКИ ИОНОВ В МЫШЦАХ ЛЯГУШКИ

Г. Г. МАРКЯН, С. Я. АДАМЯН, Ц. М. АВАКЯН

Изучалось влияние N-этилмалеинимида на мембранный потенциал, убаин-нечувствительные потоки ионов натрия и калия, концентрации АТФ, АДФ и неорганического фосфата в мышцах лягушки при добавлении в раствор протекторов SH-групп. Показано, что N-этилмалеинимид действует как на конформацию энзима, обеспечивающего противогradientную транслокацию ионов Na, так и на мембранный потенциал. Цистеамин и цистеин препятствуют действию N-этилмалеинимида, связанного с ингибированием SH-групп.

Ключевые слова: мышца лягушки, потоки Na и K, убаин, ингибитор и протектор SH-групп.

Ранее было показано, что убаин-нечувствительные потоки натрия в мышцах увеличиваются при добавлении ряда веществ [1, 3], в частности N-этилмалеинимида (НЭМ). Использование протекторов SH-групп позволит выяснить, связано ли влияние НЭМа на ионные потоки с ингибированием SH-групп или в основе его действия лежит другой механизм.

Материал и методика. Опыты проводились на портняжных мышцах озерной лягушки, обогащенных натрием. Определялись разностные потоки Na и K в мышцах, инкубированных в бескальциевом растворе Рингера с убаином в концентрации 10^{-4} М. Предполагается, что в этих условиях Na:K насос максимально заторможен. Подробное описание методики приводилось ранее [2]. НЭМ использовался в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. В качестве протекторов SH-групп были выбраны цистеамин и цистеин (10^{-4} М), эффективно защищающие клетки от радиационного поражения. В ряде опытов использовались растворы, где 90 мМ NaCl были заменены осмотически эквивалентным количеством $MgCl_2$.

Определение концентраций АТФ и АДФ проводилось энзиматическим методом в безбелковом мышечном экстракте [4, 7], а неорганический фосфат—колориметрическим [8].

Мембранный потенциал (МП) измерялся пирексовыми микроэлектродами, заполненными 3 М KCl, с потенциалом кончика—3—4 мв. Все опыты проводились строго на парных мышцах.

Результаты и обсуждение. Изменения убаин-нечувствительных разностных потоков (\bar{I}) Na и K при действии НЭМа представлены в таблице (гр. 1). Наблюдаемая разница в потоках K обусловлена изменением МП мышечных волокон, а разница в потоках Na связана с влиянием НЭМа на недиффузионный компонент натриевого потока [3].

Влияние протекторов SH-групп на потоки ионов Na и K и МП
портняжной мышцы лягушки

№ графы	Условия опыта	$\bar{\Delta J} \text{ Na}$ пкМ/см ² сек	$\bar{\Delta J} \text{ K}$ пкМ/см ² сек	$\Delta \text{ МП}$ мв
1	$\frac{\text{уабин}}{\text{уабин} + \text{НЭМ}}$	-8,0*	+3,4*	-42*
2	$\frac{\text{уабин} + \text{НЭМ}}{\text{уабин} + \text{НЭМ} + \text{цистеин}}$	+4,0*	-1,5	+28*
3	$\frac{\text{уабин} + \text{НЭМ}}{\text{уабин} + \text{НЭМ} + \text{цистеин}}$	+5,3*	-3,8	+22*
4	$\frac{\text{уабин}}{\text{уабин} + \text{цистеин}}$	-0,2	+0,5	-1
5	$\frac{\text{уабин}}{\text{уабин} + \text{цистеин}}$	+1,6	+0,2	-8
6	$\frac{\text{уабин}}{\text{уабин} + \text{НЭМ} + \text{цистеин}}$	+0,7	+1,4	-2
7	$\frac{\text{уабин}}{\text{уабин} + \text{НЭМ} + \text{цистеин}}$	-1,0	+0,7	-3

Примечание: 1) Δ —Разность между результатами, приведенными в верхней и нижней строчке каждой графы.

2) В каждой серии опытов использовалось от 6 до 16 мышц.

3) Звездочкой помечена статистически достоверная разница.

Следующая серия опытов была посвящена выяснению действия цистеаминна и цистеина на ионные потоки (табл., гр. 2, 3). Результаты опытов показали, что протекторы SH-групп препятствуют действию НЭМа, это сказывается как на величине МП, так и на концентрации макроэргических веществ в мышце.

При приложении НЭМа концентрация АТФ в мышце снижается с $3,0 \pm 0,2$ до $2,1 \pm 0,3$ мМ/кг сырого веса мышцы, а при добавлении цистеина к инкубационному раствору, содержащему НЭМ, такого снижения не происходит: концентрация АТФ равняется $2,9 \pm 0,3$ мМ/кг ($n=4$) (n —количество мышц, использованных в опыте). Соответственно концентрации неорганического фосфата составляют $5,7 \pm 0,2$ и $5,3 \pm 0,1$ мМ/кг сырого веса ($n=10$). Однако концентрация АДФ не меняется— $0,28 \pm 0,03$ и $0,32 \pm 0,03$ мМ/кг сырого веса ($n=16$).—что, вероятно, связано с аденилаткиназной активностью мышцы.

Измерение МП мышц, инкубированных в растворах с НЭМом в присутствии протекторов SH-групп, не избавляет от трудностей, обычно наблюдаемых при отведении МП в растворах с НЭМом: электрод с трудом прокалывает мышечную мембрану, при отведении МП от глубоко лежащих волокон возможна поломка электрода и т. п. Это означает, что цистеамин не вызывает нейтрализацию НЭМа в растворе, как пред-

полагал Бридж [5], а наблюдаемый эффект связан непосредственно с действием изучаемых веществ на мембрану.

Измерение МП мышечных волокон, инкубированных в бескальциевом растворе, обнаруживает существенную разницу между МП поверхностно расположенных волокон, и волокон, лежащих в глубине. Разница эта достигает 7—8 мв и статистически достоверна.

Приложение НЭМа вызывает быстрое и сильное изменение МП на поверхностно расположенных волокнах (с—134 до—40 мв) и меньшее на глубоко расположенных (до—98 мв). Возможно, это связано с тем, что диффузия гидрофобных веществ в водном растворе межклетников происходит медленнее, чем диффузия через липидную часть мембраны поверхностных волокон.

Для расчета изменения концентраций ионов согласно измеренному МП следует учитывать МП волокон по всей толще мышцы. В связи с этим были проведены следующие расчеты: средняя толщина портняжной мышцы—0,7 мм, средний диаметр волокна—100 мк. Учитывается, что наряду с толстыми волокнами, до 120—150 мк, имеются и тонкие волокна, 20—30 мк, и средние, 70—80 мк. В мышце приблизительно 7 слоев волокон: поверхностные по обе стороны мышцы с более низким МП и 5 глубинных слоев. При сопоставлении ионных потоков с изменениями МП использовался усредненный потенциал.

Были проведены контрольные опыты, выявляющие действие цистеина и цистеина на убаин-нечувствительные потоки Na и K и МП. Результаты опытов, представленные в таблице (гр. 4, 5), показали, что потоки ионов и МП не меняются.

Так как цистеамин и цистеин препятствуют действию НЭМа, то ионный состав мышцы, инкубированных в растворе НЭМ+убаин+протектор, не должен отличаться от такового мышцы, инкубированной в растворе с убаином. Обычно вызываемое НЭМом изменение МП не наблюдается при совместном действии НЭМа с протекторами. Результаты этой серии опытов также представлены в таблице (гр. 6, 7).

Сравнение МП мышц, инкубированных в растворе с протектором и в растворе протектор+НЭМ, показало, что на фоне протектора НЭМ незначительно изменяет МП мышечных волокон: от—118 до—112 в растворе с цистеамином и от —112 до—106 мв при приложении цистеина.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что действие НЭМа на убаин-нечувствительные потоки Na связано с ингибированием SH-групп белка, ответственного за противогradientную транслокацию ионов натрия.

Этот вывод согласуется с данными, полученными на микросомной фракции почки, согласно которым НЭМ и олигомицин затрудняют связывание фосфорилированного энзима с убаином. Однако при наличии в среде ионов Mg НЭМ не оказывает влияния на связывание [6].

В связи с вышесказанным была предпринята попытка выяснить действие НЭМа на ионные потоки при инкубации мышц в растворах, где 90 мМ NaCl были заменены эквивалентным количеством MgCl₂. Добав-

and inorganic phosphate concentration has been studied under the presence of sulfhydryl group protectors in solution.

It has been shown that NEM effects as on conformation of enzyme, which provides sodium antigradient translocation as well as on membrane potential. Cysteamine and cystein inhibit NEM effect connected with sulfhydryl group inhibition.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамян С. Я., Джанджугазян К. Н., Симонян А. Л. Сб. Биофизика мембран, 20, Каунас, 1973.
2. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марикиян Г. Г. Биофизика, 25, 6, 1037, 1980.
3. Марикиян Г. Г., Адамян С. Я., Симонян А. Л. Биолог. ж. Армении, 32, 11, 1158, 1979.
4. Bergmeyer H. Methods of enzymatic analysis. N.-Y. L., 266, 1963.
5. Bridges V. A. J. Gen. Microbiol., 26, 467, 1961.
6. Hegyvary C. BBA, 422, 365, 1976.
7. Lamprecht W., Trauschold J. M. Methods of enzymatic analysis, N.-Y. L., 543, 1963.
8. Stanton M. G. Anal. Biochem., 22, 27, 1968.