

INTERACTION AND FUSION OF BILAYER LIPID MEMBRANES

G. B. MELIKYAN

The interaction and fusion of bilayer lipid membranes (BLM) have been studied. The interaction of BLM passes through 3 stages: monolayer fusion, complete fusion and fission of membranes. The structural rearrangement underlying the monolayer fusion involves the formation of a trilaminar structure (single bilayer formation in the BLM contact region) as a result of local defects in the interacting monolayers. Complete fusion gives rise to the membranous tube formation. The electrostimulated and Ca^{2+} -induced fusion mechanism and the reasons of membrane tube destabilization have been investigated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Козлов М. М., Маркин В. С. Биофизика, 28, 242—247, 1983.
2. Либерман Е. А., Пенашев В. А. Биофизика, 13, 193—196, 1968.
3. Либерман Е. А., Пенашев В. А. Биофизика, 17, 1017—1023, 1972.
4. Меликян Г. Б., Козлов М. М., Черномордик Л. В., Маркин В. С. Докл. АН СССР, 274, 4, 1984.
5. Меликян Г. Б., Черномордик Л. В., Абидор И. Г., Чайлакян Л. М., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 269, 1221—1225, 1983.
6. Черномордик Л. В., Козлов М. М., Меликян Г. Б., Абидор И. Г., Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А. Биологические мембраны, 1, 411—427, 1981.
7. Chernomordik L. V., Melikyan G. B., Dubrovina N. I., Abidor I. G., Chizmadzhev Yu. A. Bioelectrochem. and Bioenerg., 12, 155—166, 1984.
8. Cherny V. V., Sokolov V. S., Abidor I. G. Bioelectrochem. and Bioenerg., 7, 413—420, 1980.
9. Frenkel'sky G. N., Gyulkhandanyan M. Z. Stud. Biophys., 26, 19—20, 1976.
10. Jamil O. P., Morty A., Neher E., Salmann B., Sigworth F. J. Pflüger Arch., 391, 85—100, 1981.
11. Melikyan G. B., Abidor I. G., Chernomordik L. V., Chaikakhyan L. M. Biochim. et Biophys. Acta, 730, 395—398, 1983.
12. Neher E. Biochim. et Biophys. Acta, 373, 328—336, 1974.
13. Pinto da Silva P., Nogueira M. L. J. Cell Biol., 692, 171—175, 1977.
14. Poste G., Nikolov G. L. (eds.) Membrane Fusion Amsterdam: Elsevier—North-Holland Biomedical Press, 835, 1978.
15. Schadt C., Fette D. FEBS Lett., 59, 36—38, 1975.
16. White S. H. Biophys. J., 23, 337—347, 1978.
17. Zimmermann U. Biochim. et Biophys. Acta, 694, 227—271, 1982.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 577.352.36

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ИОНОФОРАМИ K^+ — H^+ ОБМЕНА В ЭРИТРОЦИТАХ

А. В. ГЮЛЬХАНДЯНИ

Исследовано влияние мембранного потенциала эритроцитов крысы на скорость выхода K^+ и входа H^+ . Показано, что при индуцировании вытока K^+ валиномицином скорости K^+ — H^+ обмена повышаются при увеличении мембранного потенциала в сторону положительных значений. В случае вызванного Ca^{2+} -ионофором A23187 пере-

распределения ионов наблюдается немонотонная зависимость скоростей от мембранного потенциала.

Ключевые слова: эритроциты, мембранный потенциал, валиномицин, Ca^{2+} -ионофор A23187, K^+ — H^+ обмен

Известно, что концентрация K^+ в эритроцитах большинства млекопитающих намного выше, чем K^+ во внеклеточной среде [1, 4]. Наряду с системой активного переноса, обменивающей ионы натрия из клетки на ионы калия [6, 7], должна существовать также пассивная утечка K^+ из эритроцитов по градиенту концентрации. Поскольку на мембране эритроцитов существует мембранный потенциал [5], определяемый распределением ионов в клетке и внеклеточной среде, то изменение его должно влиять на выход ионов калия из клетки.

Материал и методика. Эритроциты из крови крысы популяции Вистар получали осаждением при 4000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге К-24. Осадок дважды промывали в тех же условиях в среде, содержащей 150 мМ NaCl в соотношении 1:5, pH среды выделения при этом доводили до 7,2—7,4 с помощью NaOH. Изменения концентрации K^+ и H^+ в суспензии эритроцитов измеряли пленочным K^+ -селективным илиономициновым и H^+ -селективным стеклянным электродами, соединенными в одной ячейке, и регистрировали с помощью pH-метров, подключенных к самописцам. Концентрацию Ca^{2+} в среде определяли пленочным Ca^{2+} -селективным электродом [2]. Изменение мембранного потенциала эритроцитов определяли по методу, основанному на измерении внеклеточного pH после добавления эритроцитов в незабуференную среду инкубации [9].

Результаты и обсуждение. В работах [3, 9] было показано, что с изменением концентрации Cl^- в среде мембранный потенциал эритроцитов изменяется, а именно с уменьшением концентрации KCl или NaCl он увеличивается со знаком «плюс» внутри.

Нами были проделаны опыты по изучению влияния мембранного потенциала на скорость потока K^+ через мембрану эритроцитов. Выход ионов калия индуцировали добавлением переносчика K^+ —валиномицина [8] или Ca^{2+} -ионофора A23187, который, перенося ионы кальция внутрь клетки, приводит к образованию специфического кальевого канала [10, 12]. Во всех случаях выход K^+ сопряжен с входом H^+ внутрь.

На рис. 1 представлена одновременная запись выхода K^+ и входа H^+ внутрь эритроцитов, индуцируемых валиномицином при различных концентрациях NaCl в среде. Как видно из рисунка, с увеличением концентрации NaCl скорости сопряженного K^+ — H^+ обмена снижаются. Если при 150 мМ NaCl в среде скорость выхода K^+ (V_{K^+}) составляла 3,9 мкмоль/мин/мл, а входа H^+ (V_{H^+}) — 0,11 pH/мин/мл, то при 50 мМ NaCl V_{K^+} и V_{H^+} были равны соответственно 5,45 мкмоль/мин/мл и 0,24 pH/мин/мл, а при 10 мМ — 7,14 мкмоль/мин/мл и 0,9 pH/мин/мл. (За величину скорости бралась средняя величина изменения K^+ или pH в течение 5 мин, деленная на 1 мл эритроцитов). Мембранный потенциал ($\Delta\varphi$) при 150, 50 и 10 мМ NaCl соответственно равнялся: —45,6 мВ, —21,2 мВ и +17,6 мВ. При подкислении среды после добавления эритроцитов мы считали, что мембранный потенциал изменяется со знаком «плюс», при подщелачивании — со знаком «минус». Некоторое от-

клонение его от величины, предписываемой уравнением Нернста, может быть вызвано наличием в среде неучтенных ионов (в частности NaCl), вносимых эритроцитами.

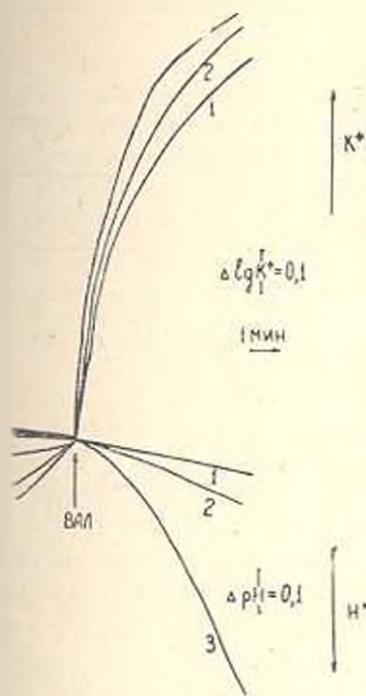


Рис. 1.

Рис. 1. Сопряженный $K^+ - H^+$ обмен через мембрану эритроцитов, индуцированный валиномицином. 3 мл среды инкубации содержит: 1. 150 мМ NaCl; 2. 50 мМ NaCl, 200 мМ сахарозы; 3. 10 мМ NaCl, 280 мМ сахарозы. Во всех случаях pH равнялось 7,2. Добавлено 0,1 мл эритроцитов и 2 нг валиномицина.

Отметим, что скорость спонтанного вытока K^+ после внесения эритроцитов в среду инкубации росла с уменьшением концентрации NaCl в среде, т. е. с увеличением мембранного потенциала со знаком «плюс».

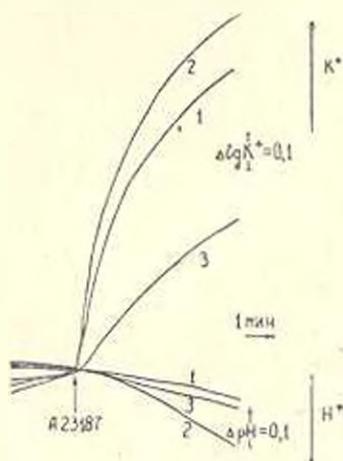


Рис. 2.

Рис. 2. Сопряженный $K^+ - H^+$ обмен через мембрану эритроцитов, индуцированный Ca^{2+} -ионофором A23187. 3 мл среды инкубации содержат: 1. 150 мМ NaCl; 2. 50 мМ NaCl, 200 мМ сахарозы; 3. 10 мМ NaCl, 280 мМ сахарозы. Во всех случаях pH равнялось 7,2. Добавлено 0,1 мл эритроцитов и $3,3 \cdot 10^{-6}$ М ионофора A23187.

В следующей серии опытов мы попытались выяснить влияние мембранного потенциала на $K^+ - H^+$ обмен, обусловленный действием Ca^{2+} -ионофора A23187. Поскольку на мембране эритроцитов имеется Ca^{2+} -АТФаза [11], «откачивающая» Ca^{2+} наружу, то добавление ионофора A23187 дает возможность ионам кальция входить внутрь и вызывать утечку K^+ . На рис. 2 представлена зависимость выхода K^+ и входа H^+ в клетки, индуцируемых A23187 при тех же концентрациях NaCl, что и в опытах, показанных на рис. 1. В среде инкубации во всех трех случаях находилось около 10^{-5} М Ca^{2+} в виде примесей от сахарозы и NaCl (определено с помощью Ca^{2+} -селективного электрода по отношению к

бидистиллированной воде, в которой концентрацию Ca^{2+} мы приняли равной 0).

В данном случае результат получился иным (табл.).

Таблица

Влияние мембранного потенциала на индуцированный А23187 $\text{K}^+ - \text{H}^+$ обмен в эритроцитах. В случаях 2, 3, 4, 5 добавлялось соответствующее количество сахаразы, чтобы суммарная осмолярность составляла бы 300 мосмолей.

Условия такие же, как в опытах, показанных на рис. 2.

№	NaCl, mM	$\Delta\psi$, мВ	V_{K^+} , мкмоль/мин/мл	V_{H^+} , рН/мин/мл
1	150	-47.6	3.27	0.107
2	50	-19	3.4	0.27
3	20	-9.4	3.06	0.22
4	10	+12.4	0.95	0.14
5	5	+24	0.51	0.13

Из рис. 2 и таблицы видно, что при 150 и 50 mM NaCl в среде данные аналогичны результатам, представленным на рис. 1 при тех же концентрациях NaCl, т. е. с уменьшением количества NaCl (при этом падает гиперполяризация мембраны) скорости сопряженного $\text{K}^+ - \text{H}^+$ обмена повышаются. Однако далее с понижением NaCl V_{K^+} и V_{H^+} уменьшаются, хотя мембранный потенциал увеличивается в сторону положительных значений. Отметим весьма интересный факт: в случае отсутствия NaCl (в среде 300 mM сахаразы) ионофор А23187 не индуцирует выток K^+ из эритроцитов. При этом уже до внесения ионофора происходит заметный выход K^+ из клеток. Скажем также, что в данном случае наблюдается видимая даже на глаз агрегация эритроцитов. При использовании же валиномицина с уменьшением концентрации NaCl в среде скорости выхода K^+ и входа H^+ увеличиваются.

Таким образом, при наличии в мембране эритроцитов калиевого ионофора валиномицина, с увеличением мембранного потенциала в сторону положительных значений, скорости сопряженного $\text{K}^+ - \text{H}^+$ обмена монотонно увеличиваются. При индуцировании выхода K^+ ионофором двухвалентных катионов А23187 наблюдается немонотонная зависимость скорости выхода K^+ от мембранного потенциала. Максимальная скорость $\text{K}^+ - \text{H}^+$ обмена отмечается при значении мембранного потенциала около -20 мВ (концентрация NaCl в среде порядка 50 mM). Это различие в скоростях ионных потоков может быть связано с разной «точкой приложения» ионофоров: валиномицин действует в мембране как подвижный переносчик, А23187 же открывает Ca^{2+} -зависимый калиевый канал. Возможно, что наиболее оптимально калиевый канал функционирует при определенном значении мембранного потенциала.

ԻՌՆՈՑՈՐՆԵՐՈՎ ԱՌԱՋԱՑԱՆ K^+ — H^+ ՓՈՒՆԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ

Ա. Վ. ԳՅՈՒԽԱՆԴԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրված է առնետի էրիթրոցիտների մեմբրանային պոտենցիալի ազդեցությունը K^+ դուրս մղելու և H^+ ներս մտնելու պարունակությունների վրա: Ցույց է տրված, որ եթե K^+ դուրս մղումն առաջացված է վալինոմիցինով, K^+ — H^+ փոխանակության արագությունները մեծանում են, երբ մեմբրանային պոտենցիալը մեծանում է դեպի դրական նշանակությունների կողմը: Ca^{2+} -իոնոֆոր A23187-ով պայմանավորված իոնների վերաբաշխման ղեկարում նկատվում է ոչ մոնոտոն արագությունների կախվածություն մեմբրանային պոտենցիալից:

INVESTIGATION OF IONOPHORE—INDUCED K^+ — H^+
EXCHANGE IN ERYTHROCYTES

A. V. GYULKHANDANYAN

Influence of rats erythrocyte membrane potential on the rates of K^+ efflux and H^+ influx has been investigated. When K^+ efflux is induced by valinomycin the rates of K^+ — H^+ exchange increase with the increase of membrane potential in the direction of positive values. In case of ions redistribution caused by Ca^{2+} —ionophore A 23187 the non-monotonous dependence of rates on membrane potentials is observed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лев А. А. Ионная избирательность клеточных мембран. Л., 1975.
2. Матерова Е. А., Грекович А. Л., Дидина С. Е. Электрхимия, 8, 1829—1832, 1972.
3. Путьинский А. В., Попов С. А., Пучкова Т. В., Данилов Ю. А., Владимиров Ю. А. Биофизика, 28, 505—506, 1983.
4. Bernstein R. E. Science, 120, 459—460, 1954.
5. Funder J., Wleth J. O. Acta Physiol. Scand., 68, 234—249, 1966.
6. Garrahan P. J., Glynn I. M. J. Physiol., 192, 159—174, 1967.
7. Garrahan P. J., Glynn I. M. J. Physiol., 192, 175—188, 1967.
8. Harris E. J., Pressman B. C. Nature, 216, 918—920, 1967.
9. Macey R. I., Adorante J. S., Orme F. W. Biochim. Biophys. Acta, 512, 284—295, 1978.
10. Reed P. W. J. Biol. Chem., 251, 3489—3493, 1976.
11. Sarcastl B. Biochim. Biophys. Acta, 604, 154—190, 1980.
12. Sarcastl B., Szasz J., Gardos G. J. Membrane Biol., 26, 357—370, 1976.