

комплексов при низкой температуре должна, по-видимому, представлять двугорбую кривую из-за присутствия в координационной сфере четырех атомов азота, расположенных в узлах ромба. Добавление DDCNa в соответствии с нашими данными по ЭПР приводит к превращению этого ромба в квадрат, что должно, на наш взгляд, ухудшить разрешение предполагаемого расщепления радиальной функции EXAFS спектров этих комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамсон А. Физическая химия поверхности. М., 1975.
2. Асатурян Р. А. Биол. ж. Армении, 36, 570—575, 1983.
3. Бреслоу Е. В кн.: Неорганическая биохимия, вып. 1, 274—290. М., 1978.
4. Asaturian R. A. Preprint Yerevan Phys. Inst., 716 (31)—84.
5. Asaturian R. A. Preprint Yerevan Phys. Inst., 717 (32)—84.
6. Breslow E. Biol. Chem., 239, 3252—3259, 1964.
7. Doniach S., Elzenberger P., Hodgson K. O. In: Synchrotron Radiation Research. New York and London, 1980.
8. Katz S., Shaw M. E., Chittag S. and Miller J. E. J. Biol. Chem., 247, 5223—5233, 1972.

Ереванский физический институт ГНАЗ СССР.

Институт тонкой органической химии

АН Армянской ССР им. А. А. Миджояни

Поступило 18.XI 1985 г.

УДК 577.352.35

ИЗМЕНЕНИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ТРАНСПОРТА H^+ В ЭРИТРОЦИТАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ Ca^{2+}

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН

Исследовано влияние Ca^{2+} и Mg^{2+} на индуцированные монофором двухвалентных катионов A23187 потоки K^+ и H^+ в эритроцитах крысы. При наличии в среде инкубации 150 мМ NaCl и значениях внеклеточного Ca^{2+} от 0,01 до 1 мМ 3,3 мкМ монофора вызывает сопряженный $K^+—H^+$ обмен через мембрану; при увеличении концентрации Ca^{2+} выше 1 мМ протинотранспорт K^+ и H^+ заменяется на одновременный выход этих ионов из клетки. При изменении мембранного потенциала в сторону положительных значений, так же как при снижении концентрации монофора A23187, для обращения потока H^+ необходимо увеличивать количество добавленного Ca^{2+} . Ионы магния заметным образом снижают скорости как сопряженного $K^+—H^+$ обмена, так и одновременного выхода K^+ и H^+ . Предполагается, что реверсия транспорта H^+ связана с увеличением потока Ca^{2+} внутрь эритроцитов.

Исследовано влияние Ca^{2+} и Mg^{2+} на индуцированные монофором двухвалентных катионов A23187-ով անալիզացած K^+ -ի և H^+ -ի հոսքերի վրա առնաձիգ էրիթրոցիտներում: Բնկերացրելով միջավայրում 150 մՄ NaCl և արտաքցելով Ca^{2+} -ը 0,01 մՄ մինչև 1 մՄ արժեքների զեպրում, 3,3 մկմ մոնոֆորը անալիզացնում է համատեղ $K^+—H^+$ -ի փոխանակություն մեմբրանով: Երբ Ca^{2+} -ը կոնցենտրացիան 1 մՄ-ից բարձր է, K^+ -ի և H^+ -ի հակադրանալիզը փոխարինվում է կայուն իոնների միասնական դուրս մղումով բոլոր երեք մեմբրանային պոտենցիալը փոփոխելով:

վում է զրական արժեքների կողմը, ինչպես նաև իոնոֆոր A23187-ի կոնցենտրացիայի նվազման դեպքում, H^+ -ի հոսքի ուղղության փոփոխության համար անհրաժեշտ է մեծացնել ավելացվող Ca^{2+} -ի քանակը: Mg^{2+} -ը ճկատելիորեն իրենցում է ինչպես համատեղ $K^+ - H^+$ փոխա-
նակության, այնպես էլ Ca^{2+} -ի և H^+ -ի միաժամանակյա դուրս մղման արագությունները: Են-
թացրկում է, որ H^+ -ի տրանսպորտի ուներսիան կապված է Ca^{2+} -ի հոսքի մեծացման հետ
զեպի կրիթրոցիտները:

The influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} on divalent cations ionophore A23187-induced K^+ and H^+ fluxes in rat erythrocytes has been investigated. In the presence of 150 mM NaCl and extracellular Ca^{2+} concentration in the range of 0.01 mM to 1 mM in the incubation medium, 3.3 μ M ionophore produces coupled $K^+ - H^+$ exchange across the membrane: by increasing Ca^{2+} more than 1 mM instead of K^+ and H^+ antiport, simultaneous efflux of these cations has been observed. In changed membrane potential to positive values, as well as decreased ionophore A23187 concentration, it is necessary to increase the amount of added Ca^{2+} to reverse H^+ flow. The magnesium ions significantly decrease the rates of $K^+ - H^+$ exchange, as well as the rates of simultaneous efflux of K^+ and H^+ . It is suggested that the reversion of H^+ flux is due to increased Ca^{2+} flow into erythrocytes.

Клико́вые крася эритроциты, ионофор двухвалентных катионов А23187, транспортиская K^+ и H^+ , мембранный потенциал

Известно, что вход Ca^{2+} внутрь эритроцитов приводит к резкому увеличению проницаемости мембран для K^+ : активируется так называемый Ca^{2+} -чувствительный калиевый канал [4, 7, 15]. Транспорта Ca^{2+} внутрь эритроцитов можно добиться истощением эндогенного АТФ при инкубации эритроцитов в отсутствие глюкозы с добавлением различных ингибиторов метаболических процессов [4, 6] или же увеличением пассивного потока Ca^{2+} , достигаемым с помощью ионофора двухвалентных катионов А23187 [8, 13, 16].

Ранее было показано [5], что индуцированный валиномицином выход K^+ по градиенту концентрации из эритроцитов связан со входом H^+ внутрь клеток.

Нами исследованы потоки K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов крысы, вызванные ионофором А23187, и действие двухвалентных ионов на этот процесс.

Материал и методика. Эритроциты из крови крысы популяции Вистар получали оседлением. Осадок дважды промывали в среде, содержащей 150 mM NaCl в соотношении 1:5. Концентрация Ca^{2+} , K^+ и H^+ измеряли пленочными Ca^{2+} и K^+ -селективными и стеклянным H^+ -селективным электродами K^+ - и H^+ -чувствительные электроды были соединены в одной ячейке. Регистрацию вели с помощью рН-метров, подключенных к самопишущим миллиамперметрам постоянного тока И-37 с усилителем И-37. Мембранный потенциал эритроцитов определяли по методу, основанному на измерении рН безбуферной среды инкубации до и после добавления эритроцитов [10]. При изменении рН в щелочную сторону мембранный потенциал брали со знаком «минус», в кислую — со знаком «плюс». Результаты измерений мембранного потенциала были обработаны статистически. Выделение эритроцитов и все опыты проводили при температуре, равной 22°.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показано действие ионов кальция на транспорт K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов, индуцированный ионофором А23187. При наличии в среде инкубации 0.01 мМ Ca^{2+} в виде примесей (измерено Ca^{2+} -чувствительным электродом по отно-

шению к бидистиллированной воде, в которой концентрацию Ca^{2+} принимали равной 0). выход K^+ сопряжен с входом H^+ . При 5 мМ Ca^{2+} происходит реверсия потока H^+ : и H^+ и K^+ одновременно выходят из эритроцитов (рис. 1 В). Этот эффект наблюдается при концентрациях Ca^{2+} , превышающих 1 мМ; при миллимолярной же концентрации изменение рН незначительно (рис. 1 Б).

Как видно из рис. 1, при концентрациях Ca^{2+} в среде, равных 0,01 и 1 мМ, нет существенного различия в скоростях выхода K^+ .

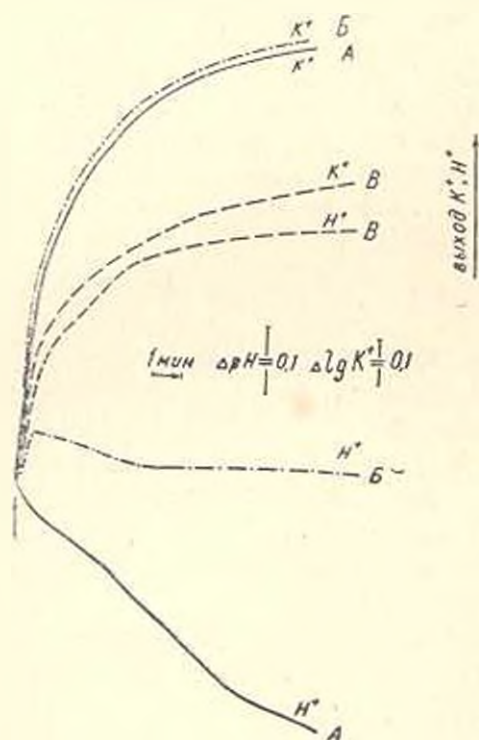


Рис. 1.

Рис. 1. Влияние Ca^{2+} на индуцированные ионофором A23187 потоки K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов. А—0,01 мМ Ca^{2+} ; Б—1 мМ Ca^{2+} ; В—5 мМ Ca^{2+} . Во всех случаях 0,1 мл эритроцитов инкубировали в течение 10 мин в 3 мл 150 мМ NaCl (рН 6,4) при соответствующей концентрации Ca^{2+} и затем добавляли 3,3 мМ ионофора A23187 (показано стрелкой).

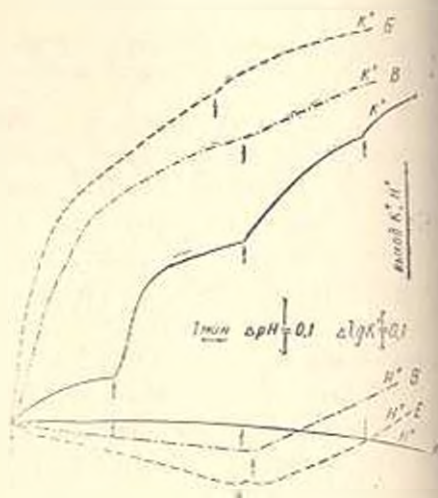


Рис. 2.

Рис. 2. Влияние Ca^{2+} на потоки K^+ и H^+ через мембрану эритроцитов при низких концентрациях ионофора A23187. А—0,01 мМ Ca^{2+} ; Б—5 мМ Ca^{2+} ; В—20 мМ Ca^{2+} . Остальные условия, кроме концентрации A23187, как на рис. 1. Стрелками показаны добавки ионофора A23187 (по 0,2 мМ).

уменьшается в среднем в 2,75 раза, а скорость выхода K^+ падает почти на 20% по сравнению с таковой при 0,01 мМ Ca^{2+} (по результатам трех измерений). (Скорость рассчитывалась по средней величине изменения количества K^+ или рН в течение 5 мин, деленной на 1 мл эритроцитов). В присутствии 10 мМ магния наблюдается слабая реверсия транспорта H^+ . Отметим также, что высокие концентрации ионов магния существенно снижают скорость реверсии потока H^+ при значении Ca^{2+} , равном 5 мМ.

При индуцировании K^+-H^+ обмена переносчиком ионов калия валиномицином ионы кальция и магния даже при высоких концентрациях не вызывают реверсии потока H^+ .

В чем же причина одновременного выхода K^+ и H^+ из эритроцитов? В данном случае, по-видимому, могут быть два объяснения: 1) идет обмен K^+ и H^+ на Na^+ или (и) на Ca^{2+} ; 2) катионы выходят совместно с анионом, скорее всего с Cl^- , для которого эритроцитарная мембрана хорошо проницаема [1] и который является основным малым исоосмотическим анионом цитоплазмы (концентрация Cl^- в эритроцитах крысы 82 мМ [3]).

В некоторых работах [2, 14] было показано, что с увеличением концентрации Ca^{2+} в эритроцитах повышается проницаемость мембраны и для Na^+ и усиливается противотранспорт K^+-Na^+ через мембрану.

Мы исследовали действие Ca^{2+} на транспорт K^+ и H^+ , инкубируя эритроциты в среде с хлоридом вместо $NaCl$. Однако и в этом случае при концентрации Ca^{2+} , превышающей 1—2 мМ, происходит синхронный выход и K^+ и H^+ .

Поскольку известно, что поток Ca^{2+} увеличивается с повышением концентрации А23187 [9, 17], мы провели опыты при низкой концентрации ионофора (0.2 мкМ). Из рис. 2Б видно, что при 5 мМ Ca^{2+} происходит K^+-H^+ обмен. При 20 мМ Ca^{2+} можно заметить лишь незначительный вход H^+ (рис. 2В). Добавление еще одной порции ионофора приводит в обоих случаях к резкому изменению направления транспорта H^+ . Скорость выхода K^+ при этом не изменяется. Интересная картина наблюдается при низких концентрациях Ca^{2+} (0.01 мМ). Последовательное добавление ионофора вызывает ступенчатый выход K^+ и вход H^+ (рис. 2А).

Следующим нашим шагом было исследование действия Ca^{2+} на транспорт K^+ и H^+ при разных концентрациях $NaCl$ в среде. Известно, что изменение количества Cl^- в среде сопровождается сдвигом мембранного потенциала эритроцитов [10], и это может оказать влияние на перераспределение ионных потоков.

Таблица. Значения Ca^{2+} , необходимые для реверсии потока H^+ , при разных величинах начального мембранного потенциала ($\Delta\psi$). Количество эритроцитов и ионофора А23187 как в опытах, показанных на рис. 1. При 50 и 10 мМ $NaCl$ с целью сохранения осмолярности в среду добавляли 200 и 280 мМ сахара соответственно

$NaCl$, мМ	150	150	50	50	10	10
$CaCl_2$, мМ	0.01	5	0.01	10	0.01	20
$\Delta\psi$, мВ	-65.9 ± 8.9 n=11	-72.8 ± 10 n=9	-23.6 ± 6.2 n=9	-41.1 ± 5.2 n=4	$+9.6 \pm 4.8$ n=7	-23 ± 5 n=4

В таблице представлены начальные величины мембранного потенциала эритроцитов при разных концентрациях $NaCl$ и тех значениях Ca^{2+} в среде, при которых происходит реверсия потока H^+ .

Видно, что со снижением концентрации NaCl в среде, когда мембранный потенциал уменьшается по абсолютной величине (увеличивается с учетом знака), для реверсии транспорта H^+ необходимо повышать концентрацию добавляемого Ca^{2+} . Возможно, что и при этом, как и при низких концентрациях ионофора, понижается скорость транспорта Ca^{2+} в эритроциты.

Известно, что ионофор А 23187, помимо активирования Ca^{2+} -зависимого калиевого канала, индуцирует также электронейтральный обмен Ca^{2+} на протоны [12]. В наших экспериментах с эритроцитами обмен Ca^{2+} на H^+ (и K^+), т. е. реверсия потока H^+ , происходит лишь при высоких концентрациях Ca^{2+} . При уменьшении концентрации ионофора или NaCl в среде для подобного обмена необходимо увеличивать количество добавляемого Ca^{2+} . Поэтому можно считать, что эффект реверсии H^+ обусловлен одновременным обменом Ca^{2+} на H^+ и K^+ при достаточно большой скорости транспорта Ca^{2+} в эритроциты (если движения H^+ нет, идет обмен Ca^{2+} на K^+). Необходимость для реверсии H^+ более высоких концентраций Mg^{2+} , по сравнению с Ca^{2+} , скорее всего связана с меньшей скоростью опосредованного А 23187 транспорта Mg^{2+} через мембраны [11]. Конечно, не исключено участие Cl^- в процессе перераспределения ионов. Уменьшение же скорости выхода K^+ из эритроцитов, проявляющееся уже с концентрацией Mg^{2+} порядка 0,1 мМ и при гораздо более высоких значениях Ca^{2+} , может быть следствием влияния двухвалентных ионов на структуру мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лев А. А. В кн.: Ионная избирательность клеточных мембран. Л., 1975.
2. Adragna N., Canessa M., Blize J., Solomon H., Tosteson D. C. *Clint. Sci.*, 61, 11—12, 1981.
3. Bernstein R. E. *Science*, 120, 459—460, 1954.
4. Gardos G. *Acta Physiol. Hung.*, 10, 185—193, 1956.
5. Harris E. S., Pressman B. C. *Nature*, 216, 918—920, 1967.
6. Lew V. S. *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 827—830, 1971.
7. Lew V. S. *J. Physiol. Lond.*, 206, 35—36, 1970.
8. Lew V. S., Ferreira H. G. *Nature*, 263, 336—338, 1976.
9. Lew V. S., Simonsen L. O. *J. Physiol.*, 308, 60, P, 1980.
10. Macey R. J., Adorante J. S., Orme F. M. *Biochim. Biophys. Acta*, 512, 284—295, 1978.
11. Moronne N. M., Cohen J. *Biochim. Biophys. Acta*, 688, 793—797, 1982.
12. Pfeiffer D. R., Taylor R. W., Lardy H. A. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 307, 402—423, 1978.
13. Reed P. W. J. *Biol. Chem.*, 251, 3489—3493, 1976.
14. Romero P. J. *J. Membrane Biol.*, 29, 329—343, 1976.
15. Romero P. J., Whittam R. J. *Physiol. Lond.*, 211, 431—507, 1971.
16. Sarkadi B., Szasz J., Gardos G. *J. Membrane Biol.*, 26, 357—370, 1976.
17. Scharf O., Foder B., Skibsted U. *Biochim. Biophys. Acta*, 730, 295—305, 1983.

Ереванский филиал Всесоюзного научного центра
хирургии АМН СССР

Поступило 22.X 1985 г.