

3. Довлатян Р. А. В кн.: Физиология и патология околощитовидных желез. Ереван, 1983.
4. Држевецкая Н. А., Мишина Н. Ф., Лиманский П. Н. В кн.: Гистогематические барьеры и нейрогуморальная регуляция. М., 1981.
5. Курский М. Д., Бакшеев Н. С. В кн.: Биохимические основы механизма действия серотонина. Киев, 1974.
6. Курский М. Д., Федоров А. А. Укр. биохим. ж. 43, 1, 110, 1971.
7. Макаров А. Ю., Левин Э. А. Лаб. дело, 12, 722, 1967.
8. Науменко Е. В. В кн.: Центральная регуляция гипофизарно-надпочечникового комплекса. Л., 1971.
9. Пидевин Н. Н. В кн.: Фармакология серотонинореактивных структур. М., 1977.
10. Худавердян Д. Н., Азгалдян Н. Р., Бакуни Г. Г. Биол. ж. Армении, 31, 8, 824, 1981.
11. Худавердян Д. Н., Арицини Г. Г., Гер-Маркосян А. С., Овсепян Р. С. Бюлл. экпер. биол. и мед., XCVII, 3, 257, 1984.
12. Azmitia E. C., McEwen B. S. I. Neurochem., 27, 3, 773, 1976.
13. Carzla R. V., Segre G. V., Clark I., Malamed S. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 167, 3, 402, 1981.
14. Meis B. Results in Neurochem., Neuroendocrinol., Neurophysiol. and Behaviour Neuropharmacol., Neuropathol., Cybern. Budapest, Acad. kiado, 9, 1976.
15. Miline R., Stern P., Hukovic S. Experientia, 14, 415, 1958.
16. Pickles V. R. J. Physiol., 138, 195, 1967.
17. Snyder S. H., Axelrod J., Zisely M. Biochem. Pharmacol., 11, 841, 1965.
18. Vermes I., Telegdy G. Results in Neurochem., Neuroendocrinol., Neurophysiol. and Behaviour Neuropharmacol., Neuropathol., Cybern. Budapest, Acad. kiado, 25, 1976.
19. Wells H., Lloyd W. Endocrinology, 84, 84, 861, 1969.
20. Woolley D. W., Gomml B. W. Arch. Internat Pharmacodyn. et Therap., 159, 8, 1966.

Поступило 20 X 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 7, 1988 г.

УДК 615.2+612.015.32:616.46—001.1/3

АКТИВНОСТЬ Na^+-K^+ АТФазы МИКРОСОМНОЙ ФРАКЦИИ МОЗГА И МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ И ПОВТОРЯЕМОМ СТРЕССЕ

Э. М. МИКАЕЛЯН, А. Л. ШАЛДЖЯН

Ереванский государственный медицинский институт, кафедра биологической химии

При остром и повторяемом стрессе активируется индуцированное ПОЛ в микросомах мозга и эритроцитарных мембранах, растет уровень дисмоных конъюгатов, подавляется активность СОД, модифицируется количественный и качественный состав липидной фазы мембран. Na^+-K^+ АТФаза эритроцитарных мембран активируется (исключение составляют показатели при 7-разовой иммобилизации), в микросомах мозга она активируется при 1- и 5-разовой иммобилизации и ингибируется при 3-, 4-, 6- и 7-разовой. Непосредственная зависимость между интенсивностью ПОЛ и активностью Na^+-K^+ АТФазы не установлена.

Сокращения: ПОЛ—перекисное окисление липидов; ИМО—иммобилизация; НЭП—НАДФН зависимое; АЗП—аскорбатзависимое; МДА—малоновый диальдегид; ФС—фосфатидилсерин; КФЛ—кислые фосфолипиды; НФЛ—нейтральные фосфолипиды; СОД—супероксиддисмутаза; ЛФХ—лизофосфатидилхолин.

Սուր և կրկնվող սարևի ժամանակ եղան և էրիթրոցիտային թաղանթների մեմբրանային ֆրակցիայում ակտիվացում է թերակցած Ca^{2+} -ն, բարձրանում է դիենային կոնյուգատների մակարդակը, ընկճվում է սուպերօքսիդ դիսմուտազի ակտիվությունը, թաղանթներում ձևափոխվում է քանակական և որակական լիպիդային կազմը: Սարևի ժամանակ էրիթրոցիտային թաղանթների Na^+/K^+ -ATP-պն ակտիվացում է (5-յանստիմյուլսի է կազմում 7 անգամ արժող իմ-մարիթիզացիան), եղան միլոսոմային ֆրակցիայում ակտիվանում է 1 և 5 անգամ արժող իմ-մարիթիզացիայի ընդամենը, և 3, 4, 6 և 7 անգամի ժամանակ՝ արժողվում է թերակցած կոմպլեքսային ի ներսում մարգարին ըրթորդաց-ման թունկեթիթյան և Na^+/K^+ -ATP պրի ակտիվացման միջև:

The induced PO_2 was activated during the acute and repeated stress in the brain microsomes and erythrocyte membrane, the level of diene conjugates increased, the activity of SOD was suppressed, the quantitative and qualitative composition of membrane lipid phase was modified, Na^+/K^+ ATP-ase of erythrocyte membrane: was activated under stress (except the 5-fold immobilization), in the brain microsomes it was activated under the 1- and 5-fold immobilization and under the 3-, 4-, 6- and 7-fold— we had 7.5 inhibition. A direct dependence between the intensity of PO_2 and Na^+/K^+ ATP-ase activity was not established.

Na^+/K^+ -ATФазы—перекисные окисление липидов—стресс

Литературные данные относительно изменения активности Na^+/K^+ -АТФазы мозговой ткани в условиях интенсификации ПОЛ несколько противоречивы. Согласно одним авторам, ПОЛ в синантосемальных мембранах мозга в условиях *in vitro* инкубирует Na^+/K^+ -АТФазу, предполагается, что это связано с окислением некоторых групп активного центра фермента [6]. С другой стороны, избыточная липидная перекисидация при эмоционально-болевого стрессе сопровождается активированием ионотранспортной АТФазы в мозговой ткани и ингибированием ее в сердечной мышце [4, 6, 9].

Другие авторы установили, что при ишемии мозга отмечается ускорение ПОЛ и повышение активности Na^+/K^+ -АТФазы, причем корреляция между этими процессами отсутствует [12]. В этой связи представляло интерес изучение активности Na^+/K^+ -АТФазы микросомной фракции мозга и эритроцитарных мембран в зависимости от показателей ПОЛ при остром и повторяемом стрессе.

Материал и методы. Опыты ставили на 150 беспородных белых крысах-самцах массой 120—150 г, разделенных на 2 группы: I—нтактные животные, II—крысы, которые подвергались ежедневной ИМО в течение 150 мин фиксации головы и конечностей. Число ИМО—по одной за семь. Однократная ИМО—острый стресс, двукратная и более—повторяемый стресс.

Ткани мозга гомогенизировали в охлажденном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,004 М трис-НСI и 0,001 М ЭДТА (рН 7,2), микросомную фракцию получали методом дифференциального центрифугирования [20].

Эритроциты окисляжали от плазмы и клеток белой крови центрифугированием, мембраны эритроцитов выделяли по методу Лимбера [17]. Активности ферментативного ИМ и ферментативного АЗП определяли по накоплению МДА за 30 мин инкубации и выражали в нмоль МДА на 1 мг белка [1].

Содержание фонольных липидных перекисей, диеновых конъюгатов, активность СОД и холестерин определяли по методам, описанным нами ранее [3].

Об активности Na^+ - K^+ -АТФазы в мозге и эритроцитарных мембранах судили по разнице между суммарной АТФазной активностью и активностью Mg^{2+} -АТФазы, выражая ее соответственно в мкмоль фосфора на мг белка за 1 ч и мкмоль фосфора на мг белка за минуту [8].

Фосфолипиды мембран эритроцитов определяли в суммарном липидном экстракте, полученном по Фолчу [11], с последующим фракционированием методом одномерной последней хроматографии на бумаге по методу Маринетти и Штоц [18] в модификации Смирнов и сотр [7] и Карагезина [2]. Содержание фосфолипидов выражали в мкг липидного фосфора на г сухого остатка мембран.

Результаты и обсуждение. При остром и повторяемом стрессе в микросомах мозга и эритроцитарных мембранах отмечаются однотипные изменения в системах, продуцирующих липоперекиси: при числе ИМО от 1 до 6 значительно активируется НЗП и АЗП ПОЛ, при 7-кратной оно подходит к контрольному уровню или снижается на 20% (рис. 1 и 2).

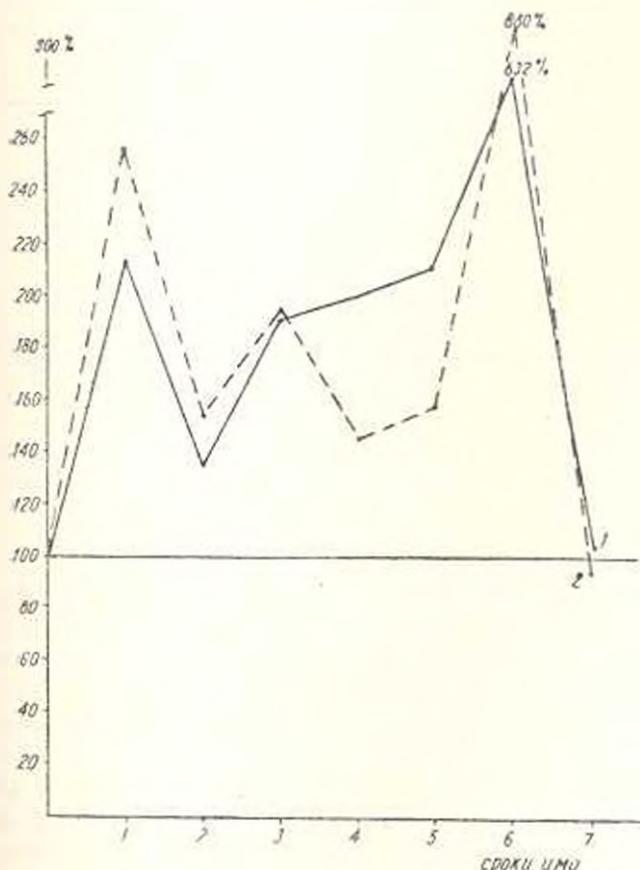


Рис. 1. Динамика ПОЛ в микросомах мозга при остром и повторяемом стрессе, % по отношению к контролю. Условные обозначения: 1 — АЗП, 2 — НЗП.

Сдвиги в активности Na^+ - K^+ -АТФазы в некоторой степени определяются видом ткани. В эритроцитарных мембранах в условиях стресса фермент в основном активируется, причем пик приходится на 3-кратную ИМО (рис. 3). При 2-разовой ИМО активность АТФазы находится на уровне контрольных величин, а при 7-разовой ингибируется

на 30%. Ионотранспортная АТФаза микросом мозга активируется при 1- и 5-разовой ИМО, тогда как при 3-, 4-, 6- и 7-разовой ингибируется (рис. 3). В обоих случаях корреляция между интенсивностью ПОЛ и сдвигами в активности АТФазы не выявлена

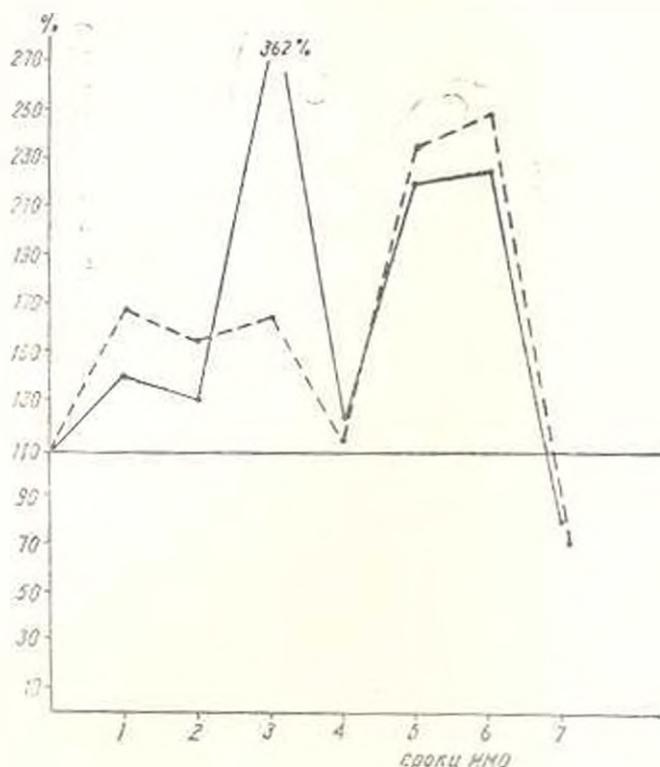


Рис. 2. Динамика ПОЛ в мембранах эритроцитов при остром и повторном стрессе, % по отношению к контролю. Условные обозначения те же, что на рис. 1

Учитывая, что при 1-, 5- и 7-разовой ИМО изменения активности фермента в микросомах мозга и эритроцитарных мембранах однотипны, мы решили сопоставить их с другими показателями интенсивности липоперекисления и липидным составом мембран. В связи с этим изучали содержание промежуточных продуктов ПОЛ дневных конъюгатов и конечного продукта—МДА, количество которого определяет исходный фон липоперекисей в тканях. Уровень дневных конъюгатов в указанные сроки стресса возрастает, а МДА в основном понижен или подходит к контролю (табл.).

Таким образом, непосредственной связи между указанными показателями и степенью, а также характером изменений активности $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФазы нет. Известно, что в условиях *in vitro* супероксидные радикалы подавляют АТФазную активность миофибрилл миокарда. Падение активности фермента предотвращается введением в среду инкубации СОД [22]. Как показали наши исследования, в условиях стресса, за исключением разового, СОД ингибируется в мозге (табл.).

Следовательно, в условиях *in vivo* непосредственная зависимость между активностью СОД и АТФазы не выявляется.

Na⁺-K⁺-АТФаза—липидзависимый фермент, активность которого зависит от упаковки липидного бислоя, от уровня холестерина, микровязкости мембраны, а также от количественного и качественного соот-

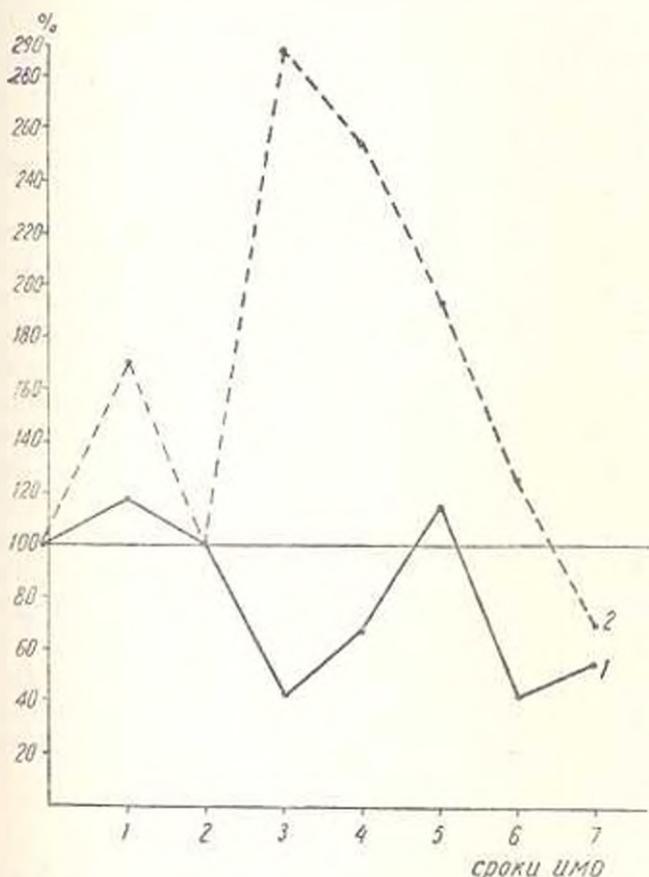


Рис. 3. Активность Na⁺-K⁺-АТФазы микросом мозга и мембран эритроцитов при остром и повторяемом стрессе, % по отношению к контролю. Условные обозначения: 1. Na⁺-K⁺-АТФаза микросом мозга; 2. Na⁺-K⁺-АТФаза мембран эритроцитов

ношения отдельных фосфолипидов, играющих роль эффекторов.

Нами был изучен фосфолипидный состав эритроцитарных мембран.

Интенсификация ПОЛ при стрессе вызывает повышение содержания в мембранах ЛФХ (табл.), который является эффектором Na⁺-K⁺-АТФазы, вызывающим ингибирование фермента с потерей специфичности [14]. Повышение количества ЛФХ на 43% при 7-разовой ИМО хорошо коррелирует с ингибированием активности АТФазы на 30% (табл.). Однако при однократной ИМО рост уровня ЛФХ на 36% сопровождается активированием АТФазы на 70%.

В модельных опытах на искусственных липидных мембранах было показано, что ионотранспортная ферментная система реактивируется ФС и другими КФЛ [13, 19]. В условиях нашего эксперимента такая

Содержание дисковых конъюгатов (мкМ/г, мкМ/мл крови), липидных перекисей, активности СОД (единица на мг белка), холестерина (мг на мг белка), фосфолипидов (мг липидного фосфора на г сухого остатка) в мазке, крови, эритроцитарных мембранах при остром и повторяемом стрессе ($M \pm m$)

Исследуемые показатели		1 контроль	2 1 НМО	% 2 от 1	3 3 НМО	% 3 от 1	4 7 НМО	% 4 от 1
Мозг	Дисковые конъюгаты	24,8±2,3	25,6±0,8	+3	52,02±1,3*	+109	37,7±1,38*	+52
	Фосфолипидные перекиси	0,34±0,01	0,34±0,16*	—	0,19±0,005*	-43	0,36±0,01	+7
	СОД	9,15±0,3	11,4±0,16	+20	6,8±0,3*	-24	4,06±0,1*	-57
Кровь	Дисковые конъюгаты	22,4±2,1	26,89±0,8*	+20	37,9±3,4*	+69	43,76±1,2*	+95
	Фосфолипидные перекиси	6,68±0,2	7,06±0,8	+6	2,6±0,1*	+61	4,87±0,17*	-28
	СОД	33,75±0,9	15,9±0,6*	+53	26,89±0,9*	+20	27,04±0,46*	-20
Эритроцитар- ные мембраны	ФС	77,05±2,3	181,68±6,2*	+136	77,36±2,4	—	91,28±2,2*	+22
	ЛФХ	187,3±0,9	253,5±5,1*	+36	199,8±1,3*	-6,7	267,7±3,9*	+43
	КФЛ	300,4±8,2	392,6±9,7*	+32	187,8±5,7*	-37	217,2±1,26*	-28
	НФЛ КФЛ	2,2	2,18	-12,7	3,41	+56	5,4	+114
	Холестерин	50,65±0,57	79,4±0,4*	+56,7	52,81±1,4*	-63	70,45±1,08*	+39
	Холестерин/фосфолипид	0,05	0,057	+14	0,099	+98	0,05	—

Примечание: *—достоверно относительно контроля

четкая зависимость проявлялась не всегда (табл.). Лишь при однократной ИМО повышалось содержание ФС и КФЛ. При 5- и 7-разовой ИМО уровень КФЛ снижался. Отношение НФЛ к кислым возрастало в течение острого и повторяемого стресса.

Конформация биомембран, степень упаковки и вязкость липидного бислоя находятся в тесной зависимости от содержания в них холестерина, от соотношения холестерин/белок, холестерин/фосфолипид. При стрессе в эритроцитарных мембранах возрастает содержание холестерина, а также отношение холестерин/фосфолипид (табл.). Подавление активности Na^+/K^+ -АТФазы на фоне увеличения уровня холестерина проявляется лишь при 7-кратной ИМО, тогда как значительный прирост холестерина в случае 1- и 5-разовой ИМО сопровождается активированием ферментной системы. Таким образом, при стрессе и условиях *in vivo* не всегда полностью воспроизводимы экспериментальные данные, полученные *in vitro* по реконструкции Na^+/K^+ -АТФазы. Поэтому нам не удалось выявить непосредственной связи между изменением активности фермента и нарушением структуры и функции мембран, обусловленных интенсификацией ПОЛ.

Одновременно известно, что важно изменение фосфолипидного состава и вязкости не всей липидной фазы, а лишь непосредственного микроокружения фермента [10, 15].

Необходимо учитывать также сдвиги гормонального фона при стрессе, так как известно, что инсулин, простагландины, катехоламины, стероиды и другие гормоны оказывают влияние на активность Na^+/K^+ -АТФазы [3, 16, 21, 23].

Итак, изменения активности Na^+/K^+ -АТФазы мембран при стрессе несомненно отражаются на мембранном потенциале клетки и реализации ее физиологической функции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирюв Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
2. Карасезян К. Лаб. дело, 1, 23, 1969.
3. Комиссаренко В. П., Ефимов Е. К. Бюлл. экпер биол. и мед., 1, 31, 1968.
4. Меерсон Ф. Э., Медведцев Л. Н., Голубева Л. Ю., Устинова Е. Е. Бюлл. экпер биол. и мед., 8, 61, 1982.
5. Микаелян Э. М., Барсегян Л. А., Мхитарян В. Г. Журн. экпер. и клин. мед., 5, 421, 1986.
6. Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В., Меерсон Ф. Э. Бюлл. экпер. биол. и мед., 5, 556, 1984.
7. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. Биохимия, 26, 6, 1023, 1961.
8. Цальмер М. К., Тарае У. С. Укр. биол. журнал, 47, 4, 458, 1975.
9. Якушев В. С., Макоев О. Б., Вержиковская В. Г., Миронови Е. В. Укр. биол. ж., 57, 3, 65, 1985.
10. Bertoli E., Fincanti S., Griffiths D. FEBS Lett, 61, 2, 163, 1976.
11. Polch J. J. Biol. Chem., 117, 2, 497, 1949.
12. Goldberg William, Watson Brand D. et al. Neurochem. Res, 9, 12, 1737, 1913.
13. Hilden S., Hokin L. Biochem. and Biophys. Res Commun., 69, 521, 1976.
14. Karli S. N., Karikas G. A. et al. Life Sci, 24, 1869, 1979.
15. Kimelberg H. K. Biochim. et Biophys. Acta, 413, 143, 1975.

16. Klein L. E., Hsiao P. et al. *Endocrinology*, 115, 3, 1018, 1984.
17. Limber G. K., Roy Dawts. *Seymour Bakerman Blood*, 36, 111, 1970.
18. Marinetti G. V., Stolz E. *Biochem et Biophys Acta*, 21, 168, 1957.
19. Ohnishi T., Kowamura H. *J. Biochem.*, 56, 377, 1964.
20. Schnolman C., Erwin V. G., Greenwalt J. W. *J. Ceel. Biol.*, 32, 719, 1967.
21. Swann Alan. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, 228, 2, 324, 1981.
22. Ventura C., Guernieri C. *Calalarera Ital. J. Biochem.*, 31, 4, 267, 1985.
23. Verna R. et al. *Prostaglandins*, 27, 72, 1984.

Поступило 9.III 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 7, 1988 г.

УДК 612.73.612.468

ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ МЕДЛЕННЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ КОЛЕБАНИЙ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МОЧЕТОЧНИКА

К. В. КАЗАРЯН, В. Ц. ВАНЦЯН

Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН АрмССР, Ереван

Показано подавление медленноволновой спонтанной активности гладкомышечных клеток мочеточника в безнатриевой среде, а также в присутствии ингибиторов Na-K-насоса и блокаторов Ca-каналов в каналах проводимости.

Ցույց է տրվում միգաներանի հարթ մկանային բջջիկների զանգաղ ալիքների սպոնտան աերիֆուլյան իոնազուսով կատրիանի բաղադրարկյան, ինչպես նաև Na-K սոսորի ինհիբիտորների և Ca-ի իոնների բլոկատորների ներդրարկյան պարտակներում անցողական կանալներում:

In Na-free solution and also at presence of Na-K pump inhibitors and Ca ion blockers in conduction canals the suppression of slow wave spontaneous activity of smooth muscular cells was shown.

Мочеточник—гладкомышечные клетки—пейсмейкерная зона—насос—каналы проводимости.

Известно, что спонтанная электрическая активность гладкомышечных клеток пейсмейкерной области мочеточника представляет собой строго ритмичные колебания разности электрохимических потенциалов на мембране в виде медленных волн. Последние являются локальным процессом, предшествуют спайковым, распространяющимся разрядам и имеют эндогенную природу [7]. Фаза деполяризации медленной волны, как правило, имеет двухкомпонентную структуру [10, 13, 14]. В работах, посвященных ионной природе возникновения волны, определяющая роль отводится таким мембранным транспортным системам, как насосные механизмы и каналы проводимости [9, 12, 15].

Целью настоящей работы явилось исследование роли некоторых катионов в возникновении как медленной волны в целом, так и при формировании отдельных ее фаз.

Материал и методика. Работу выполняли на кошках массой 3—4 кг в условиях острых опытов. Мочеточник денервировали путем перерезки корешков чревного и тазового нервов. Внутривенную перфузию почек осуществляли при помощи