

10. Lohmann B. M., Walter U., Greengard P. J. Biol. Chem., 255, 20, 9985—9992, 1980.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. Z., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
12. Steiner A. Z., Pagliara A. S., Chase J. R. J. Biol. Chem., 247, 1114—1120, 1972.
13. Zakharian R. A., Karageuzyan K. G., Ovaktimian S. S., Vardanyan M. K., Gasparian N. T. ISF—JPCS World Congress, Sept. 26—30, Tokio, 3P12, 1988.

Поступило 9.VIII 1989 г.

Бюлог. журн. Армении. № 6 (43), 1990

УДК 577.352.315:612.111.612.014.462.4

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ОКИСЛЯЮЩИМИ АГЕНТАМИ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

А. В. ГЮЛЬХАНДЖЯН, Г. М. ТЕОКЧАКЯН

Ереванский филиал Всесоюзного научного центра хирургии АМН СССР

Показано усиление под влиянием Ca^{2+} калиевой проводимости эритроцитов человека, индуцированной окисляющими агентами: электрондонорной системой аскорбат + ФМС и периодатом Na. Научены эффекты ингибиторов энергетических процессов, антиоксидантов, некоторых фенольных соединений и SH-реагентов на Ca^{2+} -зависимый выход K^+ . В отличие от действия периодата, образующего поры в мембранах, Ca^{2+} -зависимый калиевый канал, активируемый аскорбатом + ФМС, функционально связан с окислительно-восстановительными компонентами мембран. Сделан вывод о существовании различных механизмов регуляции выхода K^+ из клеток.

Տալոց է արված, որ մարդկային էրիտրոցիտներում Ca^{2+} ազդեցությամբ ակտիվանում է կալիումի ճաղորդակառնությունը, առաջացված «բարիտացող նյութերով» (էնկարոնների դոնորային սխեմով) ասկորբատ ֆենազինեթիոսուլֆատ (ՖՄՍ) և Na պերիոդատով:

Ուսումնասիրված է էներգետիկ ինհիբիտորների, անտիօքսիդանտների, որոշ ֆենոլային միացումների և SH-ոնազնետների էֆեկտները Ca^{2+} կախված K^+ էլիք վրա: Ի տալրերոմիջուկ պերիոդատի ազդեցության, որը առջեր է առաջադնում կենսաթաղանթներում, Ca^{2+} -կախված կալիումի կանալը, ակտիվացված ասկորբատ + ՖՄՍ-ով, ֆունկցիոնալ կապված է կենսաթաղանթների օքսիդակնթանակառնող կոմպոնենտների հետ: Ոնթադրվում է, որ զոլություն ունեն բիջնների K^+ էլիք տարրեր կարգավորման մեխանիզմներ:

The increase by Ca^{2+} of potassium conductivity of human erythrocytes, induced by oxidating agents, electron donor system ascorbate + phenazine (PMS) and periodate Na was shown. The effects of inhibitors of energetic processes, antioxidants, some phenol compounds and SH-reagents on Ca^{2+} -dependent K^+ efflux were investigated. In contrast to the periodate, forming pores in membranes, Ca^{2+} -dependent K^+ channel activated by ascorbate + PMS is functionally connected with membrane redox components. We concluded, that different regulatory mechanisms of K^+ efflux from cells exist.

Сокращения: ФМС—феназинметосульфат, ПОЛ—перекисное окисление липидов, ГБК—тиобарбитуровая кислота, МДА—малоновый диальдегид, ДЦКД—N,N'-дициклогексилкарбодимид, ДХФИФ—дихлорфенолиндофенол, ПХМБ—парахлормеркуробеязол, SITS—4-ацетамидо-4'-изотиазаноцилибен-2,2'-дисульфоновая кислота, НАДН—никотинамидадениндинуклеотид восстановленный.

Как известно, при интенсификации окислительных процессов происходит повреждение мембран эритроцитов, что может привести к утечке ионов из клеток [1, 14]. Показано также, что электродонорная система аскорбат—ФМС «открывает» Ca²⁺-зависимый K⁺ канал [1, 10]. При этом ФМС может вызвать образование свободных радикалов кислорода, увеличение ПОЛ мембран, превращение гемоглобина в метгемоглобин [14]. Действие другого окисляющего соединения, периодата Na, также приводит к вытоку K⁺ [5], очевидно, из-за образования пор в мембранах [13].

Ранее мы сообщали о влиянии антиоксидантов и ингибиторов энергетических процессов на обменные потоки K⁺ и H⁺ в эритроцитах человека, инкубируемых в присутствии Ca²⁺ с ионофором двухвалентных катионов A23187 или β -блокатором пропранололом, а также с переносчиком K⁺ валиномицином [2, 11].

В настоящей работе показано увеличение индуцированного периодатом Na калиевой проводимости эритроцитов под действием Ca²⁺. Изучены эффекты некоторых фенольных соединений, обладающих донорно-акценторными свойствами, ингибиторов энергетических процессов, антиоксидантов и SH-реагентов на вызванный аскорбатом+ФМС и периодатом Ca²⁺-зависимый выход K⁺ и кинетику изменения pH среды.

Материал и методика. Эритроциты выделяли из свежей гелиранизированной крови доноров центрифугированием. Затем клетки дважды промывали в 150 мМ NaCl. Опыты начинали после выдерживания эритроцитов в течение 3—4 ч при +5°. Концентрации K⁺ и H⁺ регистрировали с помощью ионного («Cytura», Чехословакия) или стеклянного (стекло марки NaX 2001) K⁺-селективных в pH («Radiometer», Дания) электродов. Электроды были соединены в одной ячейке и подключены через милливольтметры к самонаписку.

ПОЛ определяли спектрофотометрически при 532 нм по реакции образования комплекса МДА с ТБК [17]. Эритроциты, в которых измеряли ПОЛ, брали из-под электродов сразу после завершения опыта. Далее опыт проводили по методике, описанной в работе [17]. Процент гемолита клеток также определяли спектрофотометрически по выходу гемоглобина в супернатант после центрифугирования суспензии эритроцитов, подверженной воздействию тех или иных соединений.

Использовали олигомицин, ДЦКД, антимицин, ионал (4-метил-2,6-дигрезбутилфенол, азобрил, менадиол (2-метил-1,4-нафтохинон), SITS, N-этилмаленид, ФМС, α -нафтол, ДХФИФ, 2-ТБК («Serva»), α -токоферол, периодат Na («Sigma»), ПХМБ, хлорхлорид («Sigma»), дигидротритол («Koch—Light»). Остальные реактивы советского производства классификации «ос ч.» или «х. ч.».

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показаны типичная запись выхода K⁺ и кинетика изменения pH среды в суспензии эритроцитов под действием электродонорной системы аскорбат+ФМС. Скорость выхода K⁺ составляет около 2 ммоль/мин·л эритроцитов. Отметим, что в среде без Ca²⁺ выходящий поток K⁺ весьма незначителен. ДЦКД ингибирует выток K⁺ приблизительно на 70% (рис. 1А, табл.). Изменение pH двухфазное: после внесения ФМС происходит сильное защелачивание среды, сменяющееся через 1 мин закислением. Если изме-

нить очередность внесения добавок, то двухфазность изменения pH появляется после аскорбата. Олигомицин, антимицин, атебрин подавляют процесс утраты K^+ клетками на 40—90% (табл.).

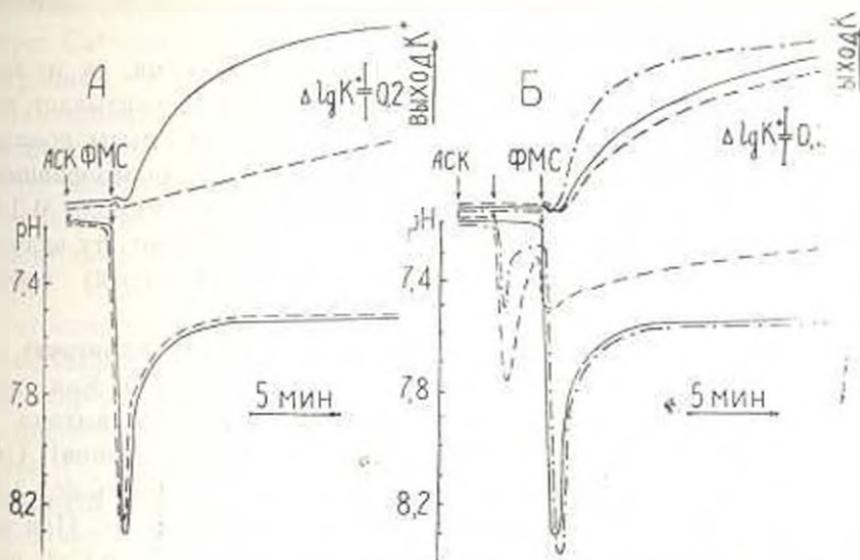


Рис. 1. Выход K^+ и кинетика изменения pH, индуцированная электрондорпной системой аскорбат+ФМС. 0,1 мл клеток внесено в 3 мл среды, содержащей 150 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$ и 0,1 мМ KCl. Добавлены: А—10 мМ аскорбата и 0,1 мМ ФМС; — — аскорбат, ФМС и 66 мкМ ДЦКД. Б—10 мМ аскорбата и 0,1 мМ ФМС; — — аскорбат, 0,1 мМ менадиона и ФМС; — — аскорбат, 0,4 мМ ДХФИФ и ФМС; стрелка без обозначения между аскорбатом и ФМС—добавление менадиона или ДХФИФ. $t = 26 \pm 1^\circ C$.

Влияние исследуемых соединений на выход K^+

Исследуемые соединения	Аскорбат	ФМС	Прирост Na
Олигомицин (13 мкМ)	+42±8	+34,5±10	* 1.1
ДЦКД (66 мкМ)	-67,5±6,5	8,8±1,5	
Антимицин (18 мкМ)	+52±4	+45±10,5	* 24±7
Атебрин (0,25 мМ)	+90±10	16±6	
Менадион (0,1 мМ)	+20±3	-16,5±2,5	
α-нафтол (0,1 мМ)	+38,5±9,5	+7±10	* 52±2
ДХФИФ (0,1 мМ)	-21,5±5,5	-65,5±5	* 40±4
ДХФИФ (0,4 мМ)	-68,5±3,5	90±5	
Ионол (0,1 мМ)	+47±13	+12,5±2	* 40±4
α-токоферол (0,1 мМ)	-5±5	-10±4,5	* 14±10
N-этилмаленид (0,3 мМ)	+54±4	+53,5±13	
ПХМБ (33 мкМ)	+56±12		
Дитиотрептол (0,35 мМ)	-10±6	+59±6,5	
SITS (80 мкМ)		+41,5±10	

Показан процент ингибирования (+) или активации (-) по отношению к контролю. Условия те же, что и в подписях под рис. 1 и 2. *В среде отсутствует Ca^{2+} . Даны результаты 3—5 измерений.

Весьма интересно действие фенольных соединений, обладающих дорпно-акцепторными свойствами (рис. 1Б, табл.). И менадион, ингибирующий выход K^+ , и ДХФИФ, увеличивающий K^+ проводимость, добав-

ленные после аскорбата, сами вызывают двухфазное изменение рН, при этом менадион угнетает опосредованный ФМС всплеск рН, а ДХФИФ, наоборот, несколько увеличивает его. Добавим, что и менадион, и ДХФИФ, добавленные до аскорбата, сами по себе всплесков рН не вызывают. Другое фенольное соединение, α -нафтол, действует аналогично менадиону (табл.).

Антиоксидант ионол ингибирует потерю K^+ клетками, в то время как другой антиоксидант α -токоферол практически не оказывает влияния на калиевую проводимость (табл.). Между тем опыты показали, что если при добавлении аскорбата + ФМС количество образовавшегося МДА, конечного продукта ПОЛ, равняется $52,88 \pm 3,85$ мкмоль МДА/л эритроцитов ($n=5$), то и α -токоферол и ионол уменьшают эту величину почти одинаково, до $42,62 \pm 3,84$ ($n=4$) и $41,65 \pm 4,8$ ($n=4$) соответственно.

Несколько по иному действуют эти соединения на калиевую проводимость, индуцированную периодатом (рис. 2, табл.). Как видно из рисунка, Ca^{2+} существенно увеличивает скорость выхода K^+ (1,12 ммоль/мин-л эр и 0,592 ммоль/мин-л эр соответственно). Отметим, что если концентрацию периодата в среде увеличить до 3 мМ, то Ca^{2+} практически не оказывает влияния на утечку K^+ . При этом второй горб по рН (рис. 2, среда без Ca^{2+}) более выражен и Ca^{2+} почти не сглаживает его.

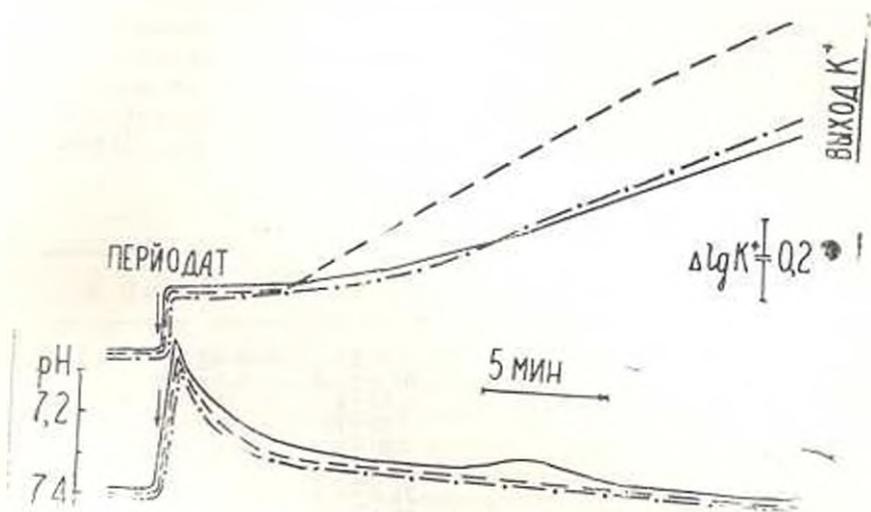


Рис. 2. Выход K^+ и кинетика изменения рН под действием периодата Na . 0,1 мл клеток внесено в 3 мл среды, содержащей 150 мМ холинхлорида и 0,1 мМ KCl . Добавлены: — 1 мМ периодата; — 1 мМ Ca^{2+} и периодат; — Ca^{2+} , 13,3 мкМ олигомицина и периодат $t=26 \pm 1^\circ C$.

ПОЛ в результате действия периодата использованным нами методом не выявлялось из-за обесцвечивания периодатом реагентов ТБК [13]. Однако в работе [13] отмечается повышение уровня дневных конъюгатов, начальных продуктов ПОЛ. В течение эксперимента (20—25 мин) гемолиз эритроцитов в результате действия периодата практически не происходит.

Представляется возможным, что подобные различия в эффектах исследуемых соединений на кальцевую проводимость обусловлены неодинаковыми механизмами регуляции выхода K^+ .

Помимо того, что электронодонорная система аскорбат + ФМС индуцирует Ca^{2+} -зависимый K^+ канал, не исключено усиление входа Ca^{2+} в эритроциты вследствие ингибирования Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, «откачивающей» Ca^{2+} из цитоплазмы активированным кислородом, образующимся под действием ФМС [12]. Известно, что в мембранах эритроцитов обнаружены НАДН-дегидрогеназная и НАДН:цитохром с-редуктазная активности и цитохром c_1 [6]. Антимицин ингибирует перенос электронов в митохондриях на участке от цитохрома c к цитохрому a [3]. Олигомицин и ДЦКД, классические ингибиторы H^+ -АТФазы митохондрий, могут связываться с НАДН-дегидрогеназой [3, 16]. Недавно было обнаружено, что ДЦКД может ингибировать НАДН:убихинон-оксиредуктазу из митохондрий сердца [18]. Атебрин же является специфическим ингибитором НАДН-дегидрогеназы плазматических мембран [7].

Эффекты фенольных соединений, менадиона, α -нафтола, ДХФИФ, а также «пространственно затрудненного» фенола ионола нуждаются в более подробном рассмотрении. Было обнаружено, что менадион на 25% подавляет НАДН-дегидрогеназную активность эритроцитов [9]. Однако затем выяснилось, что это справедливо только для обработанных детергентом тритоном X-100 клеток [8]. В среде же без тритона менадион вызывает увеличение активности НАДН-дегидрогеназы. Отметим, что для индуцирования Ca^{2+} -зависимого K^+ канала необходимо присутствие ФМС. Очевидно, что только ФМС может эффективно взаимодействовать как переносчик электронов с мембранной оксиредуктазной системой [4]. Аскорбат же необходим как донор большого количества электронов. При восстановлении мембранных компонентов, экцентирующих два электрона с кажущимся редокс-потенциалом около -47 мВ, происходит сдвиг от низкого к высокому средству ионов Ca^{2+} [4]. Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы менадиона, аскорбата, ФМС и ДХФИФ равны соответственно +8, +58, +80 и +217 мВ [3]. Можно предполагать, что имея разные потенциалы относительно аскорбата и мембранных компонентов, менадион и ДХФИФ будут или окисляться (менадион) или восстанавливаться (ДХФИФ), меняя тем самым окислительно-восстановительное состояние всей системы в целом. Это может приводить к изменению сродства мембран к Ca^{2+} и в конечном итоге уменьшать или увеличивать выток K^+ .

Можно предположить, что ингибирующее влияние α -нафтола также происходит из-за взаимодействия с редокс-цепочкой эритроцитов. В пользу этого говорит тот факт, что заместителем в нафталиновом кольце молекулы является группа OH, обладающая электронодонорными свойствами. Действие антиоксиданта ионола, но не α -токоферола, тоже может быть обусловлено взаимодействием с окислительно-восстановительными компонентами мембран; таким образом, угнетение вытока K^+ не связано с ПОЛ.

Из таблицы видно, что блокировка SH-групп N-этилмалеимидом и ПХМБ ингибирует выход K^+ , т. е. эти группы участвуют в регуляции Ca^{2+} -зависимой K^+ проводимости, индуцированной электрондонорной системой. В то же время сам факт окисления этих групп не существен, поскольку дигитроентол, восстанавливающий тиоловые группы, почти не оказывает влияния.

В работе [13] сообщалось, что периодат может образовывать поры в мембранах. Увеличение K^+ проводимости ионами Ca^{2+} говорит о том, что или активируется Ca^{2+} -зависимый K^+ канал, или Ca^{2+} действует на поры. Тот факт, что олигомицин, который блокирует Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал, каким бы путем он не образовывался [2, 15], не оказывает влияния в бескальциевой среде (табл.), служит подтверждением индуцирования канала. Можно предположить, что Ca^{2+} входит в эритроциты вследствие ингибирования Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов окисленными продуктами действия периодата или непосредственно через поры. Антимицин же, который уменьшает как Ca^{2+} -зависимый, так и Ca^{2+} -независимый выход K^+ , скорее всего, обладает какими-то побочными действиями на проводимость. Отметим, что антимицин ингибирует в эритроцитах не зависящий от Ca^{2+} выход K^+ , индуцируемый теребенциком K^+ валиномицином [2, 15].

Из таблицы видно, что ингибирование ионолом и α -токоферолом калиевой проводимости существеннее без Ca^{2+} , чем в его присутствии. Это говорит о том, что антиоксиданты не влияют на Ca^{2+} -зависимую компоненту вытока K^+ . Ингибирование же может происходить вследствие подавления процессов окисления мембранных тиоловых групп, участвующих в образовании пор [13]. Липиды же не существенны для функционирования пор [13]. Поскольку фенольные соединения могут связываться с SH-группами, то представляется возможным, что ингибирование K^+ проводимости α -нафтолом и ДХФИФ есть результат их действия на тиоловые группы. Не исключено также предотвращение окисления этих групп указанными веществами.

Периодат ингибирует образование мембранных белковых агрегатов, причем важная роль в этом принадлежит SH-группам [13]. Обработка дигитроентолом ведет к полному восстановлению прежней полипептидной картины, а N-этилмалеимид, ковалентно связывающийся с тиоловыми группами, предотвращает образование белковых агрегатов [13]. В наших опытах оба эти соединения ингибировали выток K^+ (табл.).

Ингибитор транспорта анионов SITS уменьшает выход K^+ , очевидно, по двум причинам: 1) SITS может предотвращать проникновение периодата в эритроциты через анионную транспортную систему полисы 3 мембраны, поскольку периодат является анионом сильной неорганической кислоты [13]; 2) вследствие подавления выхода Cl^- [13], который может служить сопутствующим анионом для K^+ .

Таким образом, можно прийти к выводу о существовании различных механизмов выхода K^+ из клеток, индуцированного окислительными процессами. В отличие от периодата, образующего поры, Ca^{2+} -зави-

снимый К⁺ канал, активируемый электрондонорной системой, функционально связан с мембранными редокс-компонентами и регулируется степенью воcстановленности электронтранспортной цепочки эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гюльханбян А. В. Биолог. журн. Армении, 40, 205—209, 1987.
2. Гюльханбян А. В. Биолог. журн. Армении, 42, 25—31, 1989.
3. Медлер Д. Биохимия. Пер. с англ., 2. М., 1980.
4. Alvarez J., Garcia-Sancho J., Herreros B. Biochim. Biophys. Acta, 771, 23—27, 1984.
5. Brossmer R., Bohn B. FEBS Lett., 42, 116—118, 1974.
6. Bruder G., Bretscher A., France W. W., Jarash E. — D. Biochim. Biophys. Acta, 600, 739—755, 1980.
7. Crane F. B., Löw H. FEBS Lett., 69, 153—156, 1976.
8. Fahlau R., Grygorczyk R., Fuhrmann G. F., Schwarz W. Biochim. Biophys. Acta, 978, 37—42, 1989.
9. Fuhrmann G. F., Schwarz W., Kersten P., Sdun H. Biochim. Biophys. Acta, 820, 223—234, 1985.
10. Garcia-Sancho J., Sanchez A., Herreros B. Biochim. Biophys. Acta, 556, 118—130, 1979.
11. Gyulxhandanyan A. V. Studia biophys. 133, 113—122, 1989.
12. Heibel R. P., Shatev O., Foker W., Rank B. H. Biochim. Biophys. Acta, 852, 8—16, 1986.
13. Heller K. B., Poser B., Haest C. W. M., Deuticke B. Biochim. Biophys. Acta 777, 107—116, 1984.
14. Maridonneau I., Braquet P., Garay R. P. J. Biol. Chem., 258, 3107—3113, 1983.
15. Sanchez A., Garcia-Sancho J., Herreros B. FEBS Lett., 10, 65—68, 1980.
16. Solloz M. Trends in Biochim. Sci., 9, 309—312, 1984.
17. Stocks J., Dormandy T. L. Br. J. Haematol., 20, 95—111, 1971.
18. Vuokila P. T., Hassinen I. E. Biochem. J., 219, 339—344, 1988.

Поступило 16.IV 1990 г.

Биолог. журн. Армении. № 6 (43) 1990

УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОГОРМОНА «С» НА ЗАХВАТ ³H-НОРАДРЕНАЛИНА СРЕЗАМИ СЕРДЦА КРЫСЫ ПРИ БЛОКАДЕ РЕЦЕПТОРОВ

Р. О. КАРАПЕТЯН, Т. В. ПОПОВА, М. Ш. МУРАДЯН, А. А. ГАЛОЯН
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

НС усиливает захват ³H-норадrenalина различными частями срезов сердца. Под влиянием НС при предварительной блокаде рецепторов только нейропальший ингибитор кокаин активирует захват амина во всех частях сердца, т. е. наблюдается миомышечный захват. Активация захвата ³H-нор-

Сокращения: НС—нейрогормон «С», НА—норадrenalин, ЭГТА—этиленгликоль-тетрауксусная кислота, ПП—пропранолол, ФА—фентоламин, Кок—кокаин, ДМИ—деcетиллизингамин, ИзПНА—изопропилнорадrenalин, НТ—налтрексон, Н—палоксон, Атр—атропин, Ам—амизл.