

КАЛИЕВАЯ И Ca^{2+} -ЗАВИСИМАЯ КАЛИЕВАЯ ПРОВОДИМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ. ИНДУЦИРУЕМАЯ СОЛЯМИ ТЕТРАЗОЛИЯ

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН

НИИ хирургии МЗ Армении, Ереван

Обнаружено, что соли тетразолия индуцируют калиевую и Ca^{2+} -зависимую калиевую проводимость эритроцитов человека, увеличивающуюся в присутствии протонофора СССР или ингибитора переноса электронов антимицина. Исследовано влияние ингибиторов энергетических процессов на Ca^{2+} -зависимый выход K^+ .

Գտնվել է որ տետրազոլիումի աղերը անալոգիկում են մարդկանց էրիտրոցիտների կալիումային և Ca^{2+} կախյալ կալիումային հաղորդականության, որը ուժեղանում է պրոտոնոֆոր СССР-ի կամ էլեկտրոնների փոխանցման ինհիբիտորի անտիմիցինի ներկայությամբ: Ուսումնասիրվել է ներդրումիկ պրոցեսների ինհիբիտորների ազդեցությունը Ca^{2+} կախյալ K^+ ելքի վրա:

The induction of potassium and Ca^{2+} -dependent potassium conductivity of human erythrocytes increasing in the presence of protonophore СССР and electron transport inhibitor antimycin was revealed. The action of inhibitor of energetic processes on Ca^{2+} -dependent K^+ efflux were investigated.

Эритроциты—соли тетразолия—кальевая и Ca^{2+} -зависимая калиевая проводимость—мембранный потенциал.

Существует обширная литература, посвященная влиянию различных соединений типа валиномицина, молицина, цитеридина, грамицидина, эникатина А на калиевую проводимость эритроцитов [6]. Интересным является недавно обнаруженный факт резкого возрастания калиевой проницаемости эритроцитов при совместном использовании антибиотика полимиксина В и некоторых диниоцеллолевых жирных кислот [5]. Известно также, что на мембране эритроцитов присутствует Ca^{2+} -зависимый K^+ канал, активируемый при увеличении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме [10].

В настоящем сообщении приводятся данные об индуцировании калиевой и Ca^{2+} -зависимой калиевой проводимости эритроцитов человека солями тетразолия—соединениями, для которых характерно наличие ациклического положительно заряженного гетероциклического ядра, содержащего 1 атом углерода и 4 атома азота. У 2, 3 и 5 атомов гетерокольца внедрены заместители, фенильные и нафтильные [1]. Исследовано также влияние некоторых веществ на выход K^+ и изменение рН суспензии эритроцитов.

Сокращения: СТ—синий монотетразолевый, М-НТ-М—нитратетразолия хлоридный, СССР—карбонилцианид-*о*-хлорфенилгидразон, ФМ'—феназинметосульфат, ДЦКД— N,N' -дидицилгексикарбонимид. SJTS-4—шестамидо-4'-изотиоцианотиаб-бен-2,2'—дисульфоновая кислота

Материал и методика. Эритроциты выделяли из гепаринизированной крови доноров, хранившейся в холодильнике не более 24 часов. Чтобы получить эритроциты с требуемым внеклеточным pH — pH_{II} (установившееся значение pH раствора после нескольких минут инкубации эритроцитов), клетки 2 раза промывали в растворе, содержащем 150 мМ NaCl и 20 мМ триса, с разными pH (pH_p). Была получена следующая зависимость pH_{II} от pH_p : $pH_p 8,2 - pH_{II} 7,6 - 7,7$; $pH_p 8,0 - pH_{II} 7,35 - 7,45$; $pH_p 7,8 - pH_{II} 7,2 - 7,3$; $pH_p 7,45 - pH_{II} 7,05 - 7,15$. В некоторых экспериментах с целью замены внутриклеточных анионов Cl^- на другой проникающий анион клетки сперва дважды промывали в 150 мМ $NaNO_3$ и инкубировали при комнатной температуре до 30 мин. Затем их снова промывали, инкубировали еще раз 30 мин и вновь дважды промывали.

Концентрации K^+ и H^+ измеряли с помощью стеклянных K^+ (стекло марки NaAl 27-04) и H^+ (фирма «Radiometer», Дания)—селективных электродов. В некоторых случаях использовали пленочный калиевый электрод (фирма «Cytura», Чехо-Словакия). Добавки в ячейку производили после 8—10 мин инкубации эритроцитов. Выход K^+ и сильное изменение pH наблюдали в течение 15 мин после последней добавки.

Мембранный потенциал эритроцитов определяли по методу, основанному на измерении в незабуференной среде в присутствии цитохлора СССР (pH_{II} и pH внутри клетки (pH_{II})) и вычисления по формуле Нернста [12]. За потенциал pH_{II} в данном случае принимали максимальное значение внеклеточного pH после внесения соли тетразолия и СССР. pH_{II} определяли, вызывая гемолиз клеток сапонином.

Степень гемолиза эритроцитов (по отношению к полному гемолизу) измеряли спектрофотометрически при 540 нм. В качестве контроля был использован супернатант эритроцитов, инкубируемых в течение 25 мин без каких-либо добавок.

Все исследования проводили при температуре 26—28°.

Использовали: синий монотетразолиевый $C_{27}H_{20}N_5O_4Cl$ («Chemapol»), М-нитротетразолий хлористый $C_{40}H_{30}N_{10}O_6Cl_2$, тетразолий фиолетовый $C_{20}H_{17}N_4Cl$, тетра-нитротетразолий хлористый $C_{30}H_{26}N_{12}O_{10}Cl_2$, п-нитротетразолий хлористый $C_{38}H_{26}N_{10}O_4Cl_2$ («Reanal»), олигомицин, ДНКД, эритромицин А, атебрин, валиномицин, SJTS («Serva»), СССР, три («Sigma»), холинхлорид («Chemapol»). Остальные реактивы советского производства.

Результаты и обсуждение. Из 5 использованных солей тетразолия с разными структурными формулами растворялись без осадка и этаноле только первые три. Из них индуцировали калиевую проводимость в значительной степени при концентрациях меньше 1 мМ только СТ и М-НТ. Ионы Ca^{2+} усиливали выход K^+ . Очевидно, Ca^{2+} входит в клетку и активирует Ca^{2+} -зависимый K^+ канал. Отметим, что при используемых концентрациях солей тетразолия гемолиз составлял 1—2%. С увеличением концентрации солей увеличивался как выход K^+ , так и процент гемолиза.

Положительно заряженный белок протаминсульфат (конечное количество в ячейке 0,012%) практически полностью подавлял выход K^+ , вызванный обеими солями.

В последующих опытах мы использовали в основном только СТ, причем в концентрациях, которые не вызывали гемолиза и сами по себе не индуцировали выход K^+ .

Известно, что инкубация эритроцитов с валиномицином, А23187 или пропранолом в присутствии СССР ведет к усилению выхода K^+ и гиперполяризации мембран [11]. Введение СССР после СТ также резко увеличивает калиевую проводимость. Ca^{2+} приводит к дополнительному увеличению скорости утечки K^+ и подщелачиванию среды.

отражающему гиперполяризацию мембраны. Скорости выхода K^+ в присутствии Ca^{2+} и без него достигают 2,0 и 0,4 ммоль/мин.л. клеток, а мембранный потенциал (ΔE) около -29 мВ, -16 мВ соответственно. Если предварительно инкубировать эритроциты с СССР, а затем добавлять СТ, то скорость выхода K^+ заметно повышается.

Калиевая проводимость и мембранный потенциал в присутствии Ca^{2+} зависят от внеклеточного pH. Например, при $pH_0 7,2$ скорость выхода K^+ и ΔE составляют 0,83 ммоль/мин.л. и $-26,4$ мВ, а при $pH_0 7,78$ — 5,3 и -419 соответственно. Общий выход K^+ увеличивается в основном за счет Ca^{2+} -зависимой утечки K^+ , которая определялась как разность между вытоками K^+ в присутствии Ca^{2+} и без него.

Влияние ингибиторов на выход K^+

Исследуемые соединения	Концентрация, мкМ	выход K^+			
		СТ + СССР		Антиминин + СТ	
		общий	Ca^{2+} -зависимый	общий	Ca^{2+} -зависимый
Олигомицин	13,6	$57,5 \pm 5$	100	47 ± 10	72 ± 16
ДЦКД	66	$72,5 \pm 5$	100	$8 \pm 6,5$	$19,5 \pm 10$
Антиминин	18	$35,5 \pm 7,5$	$74,5 \pm 0,5$		
Атебрин	250	$66,5 \pm 0,5$	100	$7 \pm 2,5$	100

При добавлении СТ после СССР малыми порциями (по 20—30 мкМ) выход K^+ незначителен, даже если после нескольких малых порций внести 0,2 мМ СТ. При этом суммарная концентрация его может достигать 0,5 мМ. Гиперполяризация эритроцитов также не наблюдается. Очевидно, для индуцирования калиевой проводимости необходима мгновенная примембранная концентрация соли тетраэолия.

Наблюдается увеличение калиевой проводимости эритроцитов СТ в присутствии антиминина. Ca^{2+} и в этом случае увеличивает скорость выхода K^+ (более чем в два раза) и выхода H^+ . При уменьшении pH_0 , как и в опытах с СССР, Ca^{2+} -зависимый выход K^+ понижается. Интересно, что антиминин, добавленный после СТ, или не влияет на утечку K^+ , или ингибирует проводимость, индуцируемую СТ и СССР.

В работе Савчеса и др. [14] были представлены данные, согласно которым ингибиторы переноса электронов антиминин, H^+ -АТФ-азы олигомицин, НАДН-дегидрогеназы плазматических мембран атебрин уменьшают Ca^{2+} -зависимый выход K^+ , индуцируемый проприололом, электрондонорной системой аскорбат+ФМС или ионофором А23187 (в последнем случае атебрин не ингибировал, а даже слегка увеличивал утечку K^+). Мы обнаружили, что в указанных условиях оказывает аналогичное влияние другой ингибитор H^+ -АТФазы — ДЦКД [2,3]. Увеличение pH, сопровождавшее выход K^+ в случае с проприололом или А23187, при этом полностью или частично подавляется.

* Показан процент ингибирования общего и Ca^{2+} -зависимого выхода K^+ по сравнению с контролем (без ингибиторов). Ингибиторы добавляли перед внесением СТ и СССР или антиминина и СТ, только в случае с антиминином последовательность была СТ, антиминин, СССР. Даны средние результаты 3—5 измерений.

Нами были проведены эксперименты по изучению влияния ингибиторов на выход K^+ и изменение рН, вызванное СТ в присутствии СССР или антимицина. Поскольку вклад Ca^{2+} -зависимого выхода K^+ в общую утечку K^+ зависит от внеклеточного рН, опыты были определены при рН 7,2—7,3.

Ингибиторы, указанные в таблице, подавляют в той или иной степени как выход K^+ , так и гиперполяризацию мембран. Исключение составляет только ДЦКД, который незначительно влияет на калиевую проводимость, индуцируемую антимицином и СТ.

Известно, что на мембране эритроцитов присутствует отрицательный заряд из-за наличия на ее поверхности ионизированных карбоксильных групп. Соли тетразолия вследствие своей гидрофобности, а также благодаря положительно заряженному гетерокольцу должны хорошо связываться с мембраной эритроцитов. К такому выводу приводит также резкое уменьшение калиевой проводимости клеток в присутствии положительно заряженного белка прогаминсульфата, фиксирующего отрицательные заряды на мембране. Можно предположить, что на мембране происходит образование комплекса солей тетразолия с ионами K^+ или Ca^{2+} , что приводит к увеличению пассивной проницаемости эритроцитов к этим катионам. Такое предположение вполне оправдано, поскольку восстановленные формы солей могут связываться с металлами [1], в том числе с таким щелочным катионом, как литий [4]. Альтернативное объяснение состоит в модификации мембран эритроцитов при внедрении солей, что также может служить причиной возрастания катионной проницаемости. При этом одно предположение не исключает другое.

Добавление СССР приводит к резкому усилению выхода K^+ вследствие K^+/H^+ обмена. Вхождение Ca^{2+} внутрь активирует Ca^{2+} -зависимый K^+ канал и способствует дополнительному выходу K^+ и гиперполяризации мембран.

Весьма парадоксален эффект антимицина на увеличение калиевой проводимости, тем более что сам антимицин ингибирует выход K^+ , индуцируемый СТ и СССР.

Ранее нами было выявлено, что антимицин, подавляя на 50% индуцируемый валиномицином выход K^+ , в то же время существенно увеличивает вход H^+ (выход OH^-) [2]. Основным внутриклеточным анионом в эритроцитах являются ионы Cl^- , концентрация которых равна 78 мМ [7]. Поскольку, как показали наши опыты, в среде, содержащей 150 мМ NaCl, стехиометрия индуцируемого валиномицином ($0,6 \text{ мкМ}$) K^+/H^+ обмена находилась в интервале 2,5—4, то оставшаяся часть K^+ выходила, очевидно, за счет симпорта с Cl^- . Ингибитор транспорта анионов SJTS (50 мкМ) почти на 60% подавлял выход K^+ . Нами были проделаны специальные эксперименты по замене внутриклеточного Cl^- на NO_3^- . В этом случае при добавлении валиномицина к эритроцитам, инкубируемым в 150 мМ $NaNO_3$, K^+/H^+ обмен усиливался и стехиометрия обмена достигала 1—1,5. SJTS практически не влиял на калиевую проводимость. Очевидно, при валиномицин-индуцированном выходе K^+ Cl^- более предпочти-

телен как сопутствующий анион, чем NO_3^- . В случае же отсутствия Cl^- активируется K^+/H^+ антипорт (K^+/OH^- симпорт). Возможно, антимицин ингибирует вызванную валиномицином потерю K^+ путем уменьшения выхода сопутствующих анионов, в частности Cl^- . При этом выход остальной части K^+ компенсируется за счет усиления протонной.

В случае с тетразолием также можно предположить, что антимицин усиливает калиевую проводимость вследствие индуцирования протонной. Возможны, однако, и другие побочные эффекты антимицина. Добавленный же после СТ антимицин, очевидно, теряет способность влиять на ионный транспорт.

Используемые нами ингибиторы действуют на оксиредуктазные процессы. В мембранах же эритроцитов обнаружены НАДН-дегидрогеназная, НАДН:цитохром с-редуктазная активности и цитохром b_L [8, 15]. В литературе существуют противоречивые мнения относительно связи Ca^{2+} -зависимого K^+ канала с активностью редокс-компонент. В одной из работ отмечалось отсутствие корреляции между каналом и НАДН-дегидрогеназной активностью в эритроцитах разных видов млекопитающих [13]. По мнению других исследователей, хотя и K^+ канал, и мембраносвязанная оксиредуктаза являются разными белками, активность редокс-компонент может влиять на канал [9].

При индуцировании Ca^{2+} -зависимого K^+ канала солью тетразолия совместно с СССР или антимицином можно только утверждать, что ингибиторы энергетических процессов действуют на канал, однако вопрос о том, опосредовано это оксиредуктазной системой или нет, нуждается в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берстон М. Гистохимия ферментов. Пер. с англ. М., 1965.
2. Гюльханджян А. В. Биолог. журн. Армении, 42, 25—31, 1989.
3. Гюльханджян А. В. Биолог. журн. Армении, 43, 478—483, 1990.
4. Давидова С. П. Удивительные макроциклы. Л., 1989.
5. Корепанов Е. А., Сидоров Е. П., Шевченко Е. В., Кожомкулов Э. Т., Мельнико А. А., Владимиров Ю. В. Биол. мембраны, 2, 738—746, 1985.
6. Овчинников Ю. А., Иванова В. Т., Шкряп А. М. Мембрано-активные комплексы. М., 1974.
7. Benedetti A., Corpein M. Bioelectrochem. and Bioenerg., 18, 1—3, 187—203, 1987.
8. Bereznev R. D., Frank L. D. Biochim. et biophys. acta, 203, 5, 513—543, 1970.
9. Biobel G., Franke V. Science, 154, 6—79, 1965.
10. Gliese G., Franke W. Anat. Biochem., 100, 2, 282—288, 1972.
11. Lowry O., Rosentrough N., Farr A. G. Biochem. and biophys. Res. Comm., 112, 3, 919—924, 1987. Biol. Chem., 193, 1, 265—271, 1951.
12. Nakano M., Sugloka K., Natto I. Biochem. and biophys. Res. Comm., 112, 3, 919—924, 1987.
13. Sugloka K., Shimosegawa Y., Nakano M. FEBS Letters, 210, 1, 37—39, 1987.
14. Vaca C., Wilhelm J. Biochimica et biophysica Acta, 954, 3, 375—387, 1988.
15. Vaca C., Harms-Ringdahl M. Biochimica et biophysica Acta, Lipid and Lipid Metab., 100, 1, 35—43, 1989.

Получено 23.III 1991 г.