

БИОХИМИЯ

А. С. Оганесян

К вопросу о регуляции проницаемости клеточной оболочки

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 17/V 1967)

По современным данным переход ряда веществ (глюкоза, аминокислоты, ионы калия и натрия, фосфаты и др.) через клеточные мембраны некоторых тканей (мозговая, мышечная, почечная, эпителий тонкого кишечника и др.) осуществляется путем активного транспорта и связан с затратой энергии. Источником энергии является аденозинтрифосфат (АТФ). Активный транспорт через клеточные мембраны связан с вовлечением в этот процесс определенного компонента клеточной оболочки в виде переносчика (carrier), который, комбинируясь с транспортируемым веществом, переносит его из наружной поверхности оболочки на ее внутреннюю поверхность.

Исследования ряда авторов, а также наши, показали, что процесс активного транспорта ферментативный и протекает с участием мембранной аденозинтрифосфатазы (АТФ-аза). Нами было установлено, что в мозговой, мышечной и почечной тканях АТФ-аза принимает непосредственное участие в процессах транспорта глюкозы и ионов натрия и калия.

Известно, что в аэробных условиях подавляется гликолиз. Механизм этого явления до сих пор остается спорным. Одни авторы считают, что в аэробных условиях подавляется активность ряда ферментов, участвующих в различных этапах гликолиза. По данным же других авторов, некоторые продукты окислительного фосфорилирования, как аденозинтрифосфат (АТФ), подавляют активность фосфофруктокиназы, который стимулирует превращение фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-дифосфат. Этот процесс является лимитирующим звеном гликолитического превращения глюкозы.

В литературе имеются сообщения об усилении транспорта глюкозы в анаэробных условиях по сравнению с таковым в аэробных (¹⁻⁶). Наши исследования показали, что трансмембранный перенос глюкозы в некоторых тканях (мозговая, мышечная и почечная) тесно связан с активностью мембранной АТФ-азы клеток. Повышение активности этого фермента (инсулином, АТФ-ом и др.) вызывает ускорение транспорта

глюкозы и усиление гликолиза, и, наоборот, подавление его активности путем окисления или блокирования его сульфгидрильных групп (строфантин, пара-хлормеркурибензойной кислотой—ПХМБ и N-этилимином малеиновой кислоты—НЭМ) приводит к торможению поглощения глюкозы и подавлению гликолиза. Было показано также, что восстановление сульфгидрильных групп АТФ-азы восстановленным глутатионом, цистеином, а также добавлением аденозинтрифосфата (АТФ) устраняет тормозящий эффект строфантина и тиоловых реагентов как в отношении транспорта глюкозы, так и в отношении гликолиза и активности АТФ-азы.

Имея в виду эти данные, мы предположили возможность регуляции гликолиза скоростью трансмембранного переноса глюкозы, что в свою очередь может регулироваться обратимым изменением активности мембранной АТФ-азы.

Для выяснения этого вопроса мы провели ряд исследований по изучению регуляции транспорта глюкозы через клеточные мембраны мозговой ткани в аэробных (O_2) и анаэробных (N_2) условиях. Опыты были проведены со срезами коры больших полушарий головного мозга, которые инкубировались в фосфатном буфере $pH=7,4$, в течение одного часа при температуре $37^\circ C$. Глюкоза определялась по Дюмазеру, глутатион—по Вудварду и Фрей⁽⁷⁾, активность АТФ-азы—по Бонтингу и сотр.⁽⁸⁾ с некоторыми видоизменениями⁽⁹⁾.

Как показывают данные, приведенные в табл. 1 и 2, тиоловые реагенты—ПХМБ и НЭМ, строфантин, окисленный глутатион и цистин подавляют поглощение глюкозы мозговой тканью и оказывают ингибирующее действие на активность АТФ-азы. Восстановленный глутатион, цистеин и АТФ снимают тормозящий эффект этих веществ, как в отношении транспорта глюкозы, так и в отношении активности АТФ-азы.

Данные табл. 3 и 4 показывают, что в анаэробных условиях, по сравнению с аэробными, поглощение глюкозы усиливается срезами мозговой ткани, а активность АТФ-азы повышается. Это особенно выражено при инкубировании срезов мозговой ткани в атмосфере чистого кислорода.

Результаты этих опытов показали важное значение восстановленного глутатиона в процессах транспорта глюкозы. В дальнейшем путем преинкубирования (в течение 30 минут) мы добились понижения содержания глутатиона в мозговой ткани¹. Затем изучали влияние добавленного глутатиона на поглощение глюкозы и активность АТФ-азы. Результаты этих опытов (табл. 5—6) показывают, что при понижении содержания глутатиона в мозговой ткани наблюдается некоторое подавление поглощения глюкозы и активности АТФ-азы. Добавление же при этом глутатиона (восстановленного) приводит к повышению активности АТФ-азы и усилению поглощения глюкозы.

¹ При инкубировании срезов мозговой ткани наблюдается значительное понижение содержания глутатиона в результате ускорения его метаболических превращений и выхода из клеток в инкубируемую среду.

Таблица 1

Поглощение глюкозы (мг/г ткани час) мозговой тканью (срезы) в присутствии реагентов (в миллимолях) тиоловых групп

Контроль	ПХМБ 1	ПХМБ + АТФ 6	ПХМБ Гл-SH 1,25	ПХМБ+ Гл-SH + АТФ 6	ПХМБ+ Цистеин 1,25	НЭМ 1	НЭМ+ АТФ 6	НЭМ+ Гл-SH 1,25	НЭМ+ Гл-SH + АТФ 6	НЭМ+ Цистеин 1,25	Цистеин 1,25	Строфан- тин 1	Строфан- тин+ АТФ 6	Строфан- тин+ Гл-SH 1	АТФ 6	Гл-SH	Гл-S-S	Цистин
8,1	3,1	5,1	7,5	11,9	6,8	0,35	1,4	7,5	11,5	7,2	7,9	3,24	7,1	5,3	12,1	8,3	5,6	6,3
±0,7	±0,45	±0,67	±0,95	±0,9	±0,84	±0,02	±0,2	±0,4	±2,1	±0,85	±0,8	±0,4	±0,1	±0,35	±	±		
(11)	(11)	(6)	(8)	(4)	(5)	(10)	(6)	(4)	(5)	(4)	(5)	(7)	(5)	(5)				

Примечание: Гл-SH — глутатион восстановленный.
Гл-S-S — глутатион окисленный.
Цифры в скобках — количество опытов.

Таблица 2

Изменение активности АТФ-азы (Р мг/г ткани/час) мозговой ткани (срезы) в присутствии тиоловых реагентов и АТФ (в миллимолях)

Контроль	АТФ 6	Гл-SH 1,25	Гл-SH + АТФ	ПХМБ 1	ПХМБ+ Гл-SH 1	ПХМБ+ Цистеин 1,25	ПХМБ + АСФ	ПХМБ+ Гл-SH + АТФ	НЭМ 1	НЭМ+ Гл-SH 1	НЭМ+ Цистеин 1,25	НЭМ+ АТФ	НЭМ+ Гл-SH + АТФ	Строфан- тин 1	Строфан- тин+ Гл-SH 1	Строфан- тин+ АТФ
0,43	0,85	0,54	1,08	0,18	0,41	0,4	0,83	1,02	0,3	0,4	0,38	0,89	1,11	0,28	0,38	0,38
±0,04	±0,007	±0,05	±0,07	±0,01	±0,04	±0,03	±0,05	±0,05	±0,03	±0,02	±0,04	±0,05	0,07	±0,03	±0,05	±0,05
(8)	(7)	(7)	(5)	(6)	(6)	(4)	(5)	(5)	(7)	(5)	(4)	(5)	(5)	(7)	(5)	(5)

Как показывают данные, приведенные в табл. 7, добавление АТФ в инкубационную среду приводит к ускорению образования молочной кислоты мозговой тканью (усиление гликолиза), а тиоловые реагенты и строфантин, наоборот, подавляют этот процесс. АТФ и глутатион снимают тормозящий эффект тиоловых реагентов и строфантина. С другой

Таблица 3

Поглощение глюкозы (мг/г ткани/час) мозговой тканью (срезы) в аэробных и анаэробных условиях в присутствии и отсутствии восстановленного глутатиона (в миллимолях)

Газовая фаза	Контроль	Гл—SH 1,25
O ₂	$7,9 \pm 0,85$	$8,5 \pm 0,7$
N ₂	$9,5 \pm 1,2$	$9,3 \pm 0,9$

Таблица 4

Активность АТФ-азы (Рмг/г ткани/час) мозговой ткани (срезы) в аэробных и анаэробных условиях в присутствии восстановленного глутатиона (в миллимолях)

В условиях воздуха	Аэробные условия (O ₂)	Аэробные условия + Гл—SH 1,25	Анаэробные условия (N ₂)	Анаэробные условия + Гл—SH 1,25
$0,5 \pm 0,04$ (10)	$0,36 \pm 0,04$ (7)	$0,48 \pm 0,05$ (5)	$0,68 \pm 0,06$ (5)	$0,65 \pm 0,04$ (4)

стороны, установлено, что АТФ повышает активность АТФ-азы мозговой ткани, а тиоловые реагенты и строфантин, наоборот, подавляют.

Результаты опытов показывают, что сульфгидрильные группы миозина (АТФ-аза) клеточной оболочки мозговой ткани имеют важное значение для проявления его ферментативной активности и для осуществ-

Таблица 5

Влияние глутатиона (в миллимолях) на поглощение глюкозы (мг/г ткани/час) срезами мозговой ткани

К о н т р о л ь		П р е и н к у б а ц и я	
Мозговая ткань	Мозговая ткань + Гл—SH 1,25	Мозговая ткань	Мозговая ткань + Гл—SH 1,25
$8,6 \pm 0,45$ (7)	$8,8 \pm 0,5$ (5)	$7,0 \pm 0,4$ (5)	$9,0 \pm 0,5$ (5)

ления активного транспорта глюкозы. Блокирование сульфгидрильных групп мембранной АТФ-азы (срезы) приводит к подавлению активности АТФ-азы и транспорта глюкозы и, наоборот, восстановление этих групп (добавлением глутатиона) повышает активность АТФ-азы и усиливает транспорт глюкозы. Наши прежние исследования (^{10,11}) показали, что подавляющее действие тиоловых реагентов на транспорт глюкозы в моз-

говую ткань связано именно с их действием на мембранную АТФ-азу. В этом отношении результаты наших исследований косвенно подтверждают данные Парка и сотр. (12) о том, что тиоловые реагенты не оказывают подавляющего действия на активность фосфоглицеральдегиддегидрогеназы, активной группой которого является восстановленный глутатион. Эти данные дали нам основание предполагать, что роль глутатиона в процессах транспорта глюкозы через клеточные мембраны, по-видимому, сводится к поддержанию активности АТФ-азы клеточной оболочки. В связи с этим мы изучали изменение количества добавленного к ин-

Таблица 6

Влияние восстановленного глутатиона (в миллимолях) на активность АТФ-азы (P мг/г ткани/час) мозговой ткани (срезы)

К о н т р о л ь		П р е и н к у б а ц и я	
Мозговая ткань	Мозговая ткань Гл—SH 1,25	Мозговая ткань	Мозговая ткань Гл—SH 1,25
0,51 (10)	0,56 (8)	0,4 (5)	0,52 (5)

Таблица 7

Образование молочной кислоты (мг/г ткани/час) мозговой тканью (срезы коры) в присутствии АТФ, строфантина и ингибиторов тиоловых групп (в миллимолях)

Контроль	АТФ 6	Гл—SH 1,25	ПХМБ 1	ПХМБ— Гл—SH	ПХМБ АТФ	НЭМ 1	НЭМ + Гл—SH	НЭМ + АТФ	Строфан- тин 1	Строфан- тин + АТФ	Строфан- тин + Гл—SH
7,0 ±0,5 (8)	8,75 ±0,7 (8)	8,1 ±0,8 (5)	3,7 ±0,2 (5)	6,0 ±0,5 (5)	6,5 ±0,4 (5)	2,2 ±0,2 (4)	5,16 ±0,4 (5)	6,1 ±0,6 (5)	4,2 ±0,3 (4)	7,2 ±1,1 (5)	6,7 ±0,8 (5)

Таблица 8

Изменение содержания восстановленного (добавленного) и окисленного глутатиона в инкубируемой среде (мг%) в присутствии мозговой ткани в аэробных и анаэробных условиях

Газовая фаза	Содержание Гл—SH в инкубируемой среде		Содержание Гл—S—S в инкубируемой среде	
	до инкубации	после 60 мин. инкубации	до инкубации	после 60 мин. инкубации
O ₂	38,4 (5)	30,7 (5)	0,3 (5)	6,26 (5)
N ₂	39,5 (5)	37,5 (5)	0 (4)	0,26 (5)

кубационной среде восстановленного глутатиона в аэробных и анаэробных условиях. Результаты исследований показали (табл. 8), что в аэробных условиях часть добавленного глутатиона (восстановленного), окисляясь, превращается в его окисленную форму ($S-S$), между тем как в анаэробных условиях количество восстановленного глутатиона почти не изменяется. Интересно отметить, что в аэробных условиях при инкубировании срезов мозга часть глутатиона выходит из клеток в инкубируемую среду. Однако в присутствии глюкозы и АТФ выход глутатиона из клеток подавляется, более того, в присутствии АТФ ускоряется поступление глутатиона в мозговую ткань и ускоряется его внутриклеточное превращение.

Приведенные данные показывают, что активность мембранной АТФ-азы, принимающей участие в процессе транспорта глюкозы, может изменяться в зависимости от изменения газовой фазы инкубируемой среды. В анаэробных условиях активность этого фермента повышается и усиливается транспорт глюкозы, а в атмосфере кислорода активность фермента сравнительно низка и транспорт глюкозы замедлен. Следует отметить, что в аэробных условиях глутатион снимает подавляющий эффект строфантина и тиоловых реагентов на активность АТФ-азы и восстанавливает нормальную картину транспорта глюкозы в мозговой ткани.

Результаты наших опытов дают нам основание полагать, что изменение транспорта глюкозы в зависимости от условий инкубируемой среды (аэробный или анаэробный) связано с состоянием SH-групп мембранной АТФ-азы. По-видимому, в аэробных условиях часть сульфгидрильных групп мембранной АТФ-азы окисляется, превращаясь при этом в дисульфидные, в результате чего активность АТФ-азы понижается, а транспорт глюкозы замедляется и, наоборот, в анаэробных условиях в ткани накапливаются вещества в восстановленном виде, которые восстанавливают $S-S$ -группы АТФ-азы в SH, и тем самым повышают ее активность, что приводит к усилению транспорта глюкозы.

В литературе имеются указания ⁽¹³⁾ на то, что в аэробных условиях сульфгидрильные группы тканевых белков могут подвергаться окислению. В связи с этим можно полагать, что SH-группы мембранной АТФ-азы в зависимости от изменения среды непрерывно подвергаются обратимым изменениям $2 SH \rightleftharpoons S-S$, что может привести к соответствующим изменениям в структуре клеточной оболочки, следовательно и к изменению ее проницаемости. Подобные динамические обратимые изменения физико-химического состояния белков клеточной оболочки, возможно, лежат в основе регуляции ее проницаемости и транспорта веществ. Не исключена возможность, что в основе изменения проницаемости клеточной оболочки, наблюдаемой под действием различных гормонов, лежат упомянутые биохимические сдвиги в пределах клеточной мембраны.

Результаты наших исследований, наряду с другими факторами, в определенной мере могут способствовать объяснению феномена — подавления гликолиза дыханием (пастеровского эффекта) и усиления

этого процесса в анаэробных условиях. Мы не отрицаем роли внутриклеточных систем, принимающих участие в регуляции гликолиза, однако они начинают действовать после поступления глюкозы во внутрь клетки. В свою очередь внутриклеточные метаболические процессы оказывают соответствующее влияние на мембранную проницаемость. Тем не менее результаты наших исследований показывают важную роль скорости транспорта глюкозы как начального звена в регуляции гликолиза внутри клетки.

Институт биохимии Академии наук
Армянской ССР

Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Բջջի թաղանթի թափանցելիության կանոնավորման հարցի շուրջը

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների ուղեղի մեծ կիսագնդերի կեղևի կտրվածքների վրա:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ բջջի թաղանթի կազմության մեջ գտնվող աղենոգինորիֆոսֆատազան (ԱՏՖ-ազա) աղենոգինորիֆոսֆատի (ԱՏՖ) հետ միասին կարևոր դեր է խաղում թաղանթային թափանցելիության կանոնավորման պրոցեսներում: Այդ ֆերմենտի սուլֆհիդրիլ խմբերը մեծ նշանակություն ունեն նրա ֆերմենտային հատկության ցուցաբերման և բջջի թաղանթով գլյուկոզայի փոխադրման դործում: ԱՏՖ-ազայի սուլֆհիդրիլ խմբերի օքսիդացումը բերում է նրա ֆերմենտային ակտիվության իջեցմանը և գլյուկոզայի կլանման նվազեցմանը և ընդհակառակը: Անաէրոբ պայմաններում (աէրոբ պայմանների համեմատությամբ) նկատվում է գլյուկոզայի կլանման ուժեղացում և ԱՏՖ-ազայի ակտիվության բարձրացում: Մյուս կողմից, գրականության տվյալների համաձայն, հյուսվածքային սպիտակուցների սուլֆհիդրիլ խմբերը աէրոբ պայմաններում կարող են օքսիդանալ և վերածվել դիսուլֆիդ խմբերի, իսկ անաէրոբ պայմաններում — վերականգնվել: Ուղեղային հյուսվածքում վերականգնված գլյուտատիոնը նպաստում է ԱՏՖ-ազայի ակտիվության պահպանմանը բարձր մակարդակի վրա և գլյուկոզայի կլանմանը, աէրոբ պայմաններում:

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս ենթադրելու, որ սովորական պայմաններում բջջի թաղանթի թափանցելիությունը կարգավորվում է ԱՏՖ-ազայի ակտիվության դինամիկ փոփոխմամբ, որն իր հերթին կապված է միջավայրի պայմանների փոփոխության հետ:

ЛИТЕРАТУРА — Պ Ե Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ А. С. Оганесян и А. А. Демирчян, ДАН АрмССР, 40, 285 (1965). ² А. С. Оганесян, ДАН АрмССР, 35, 217 (1962). ³ А. С. Оганесян, Известия АН АрмССР, сер. биол. наук, 15, 8, 39 (1962). ⁴ П. Д. Рандл, in: Membrane transport and metabolism, Ed. by Kleinceller A. A. and Kotyk E. E., Pragua, 1960. ⁵ Г. Е. Морган, М. Д. Гендерсон, Д. М. Реген, и С. Р. Парк, J. Biol. Chem., 236, 253, 1961. ⁶ Г. Мак-Ильвейн, Биохимия и центральная нервная система, 1962. ⁷ Ж. Е. Вудвард и Ж. Е. Фрей, J. Biol. Chem., 97, 465, 1932. ⁸ С. Л. Бонтинг, К. А. Симон и Н. М. Гавкинс, Arch. Biochem. Biophys. 95, 416, 1961. ⁹ А. С. Оганесян, ДАН АрмССР, 35, 177 (1962). ¹⁰ А. С. Оганесян и А. А. Демирчян, Вопросы биохимии мозга, 3, 1967. ¹¹ А. А. Демирчян, Биол. журн. Армении, 20, (1), 68, 1967. ¹² Г. Е. Морган, Д. Р. Нули, Р. Е. Вууд, С. Либек, А. Либермейстер и С. Р. Парк, Fed. Proc., 24, 1040, 1965. ¹³ П. С. Жоселин, Biochem. J., 85, 491, 1962.