

УДК 577.352.5-612.822

БИОХИМИЯ

А. Р. Акопян, С. Н. Айрапетян, Н. К. Чемерис

Диализируемый нейрон как новая модель для исследования электрогенного натриевого насоса

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 14/XI 1978)

Методика внутриклеточного диализа нейрона, предложенная Костюком и сотр. (¹), открывает широкую перспективу для изучения свойств мембран. С помощью этой методики стало возможным исследование свойств ионных каналов, обеспечивающих трансмембранный пассивный транспорт ионов, контролируя состав внутриклеточной среды (²). Вопрос о состоянии ферментных систем, лежащих в основе активного транспорта веществ через мембрану диализируемых нервных клеток, остается еще открытым.

Задачей настоящей работы являлось изучение состояния и свойств электрогенного натрий-калиевого насоса в мембране диализируемого нейрона, с целью определения применимости их для дальнейшего исследования механизмов трансмембранного активного транспорта веществ.

Изолированные нейроны *Helix Pomatia* и *Lymnea Stagnalis* получали методом ферментативной обработки проназой (3 мг/мл) в течение 50—40 минут соответственно, при комнатной температуре (³). Наружный физиологический раствор имел следующий состав: (в мМ) NaCl—80, KCl—4, CaCl₂—8, MgCl₂—8, Трис—HCl—5, pH—7,5 и NaCl—100, KCl—1,6, CaCl₂—4, MgCl₂—4, Трис—HCl—5, pH—7,5, соответственно для *Helix Pomatia* и *Lymnea Stagnalis*. При увеличении концентрации калия в наружном растворе эквивалентно, уменьшали концентрацию натрия, чтобы поддержать осмотичность раствора. Внутриклеточный стандартный раствор содержал 90 мМ KCl и Трис-HCl для поддержания осмотичности и pH—7,3.

Использовали АТФ (динатриевая соль) фирмы «Реанал». Убанин фирмы «Калбиохем» готовили непосредственно перед опытом в концентрации 2×10^{-4} М.

Внутриклеточный диализ и фиксацию потенциала на мембране проводили как описано в работе Костюка и сотр. (¹).

Известно, что для выявления электрогенного натриевого насоса измеряется мембранный потенциал или трансмембранный ток в усло-

ниях активации и инактивации активного транспорта ионов через клеточную мембрану путем изменения концентрации натрия внутри, калия—вне клетки, изменения температуры среды и действия метаболических активаторов и ингибиторов (^{4,5}). Эти методы были использованы и в настоящих исследованиях.

Для активации натрий-калиевого насоса во внутриклеточную безнатриевую среду добавляли 10 мМ натрия. В ответ на это развивался небольшой выходящий (гиперполяризационный) ток, который резко возрастал при введении внутрь клетки 1 мМ АТФ, и обратимо подавлялся при внешней аппликации сердечного гликозида-уабанина, являющегося ингибитором натриевого насоса (рис. 1). Эти эффекты указывают на то, что в процессе диализа нейрона Na-K АТФаза мембраны не потеряла своей активности.

Для подтверждения того, что мы имеем дело с выходящим током, вызванным работой электрогенного натриевого насоса, исследовали его зависимость от наружной концентрации ионов калия.

В экспериментах, выполненных на целостных нейронах, было показано, что повышение наружной концентрации калия оказывает двоякое действие на мембранный потенциал. С одной стороны, калий деполаризует мембрану из-за снижения калиевого равновесного потенциала, а с другой—гиперполяризует мембрану путем активации работы электрогенного натриевого насоса (⁶). Такое действие калия является основной причиной отличия электродных свойств мембраны от свойств калиевого электрода при низких концентрациях калия в среде. Как видно из рис. 2, аналогичную картину мы наблюдаем и в диализируе-

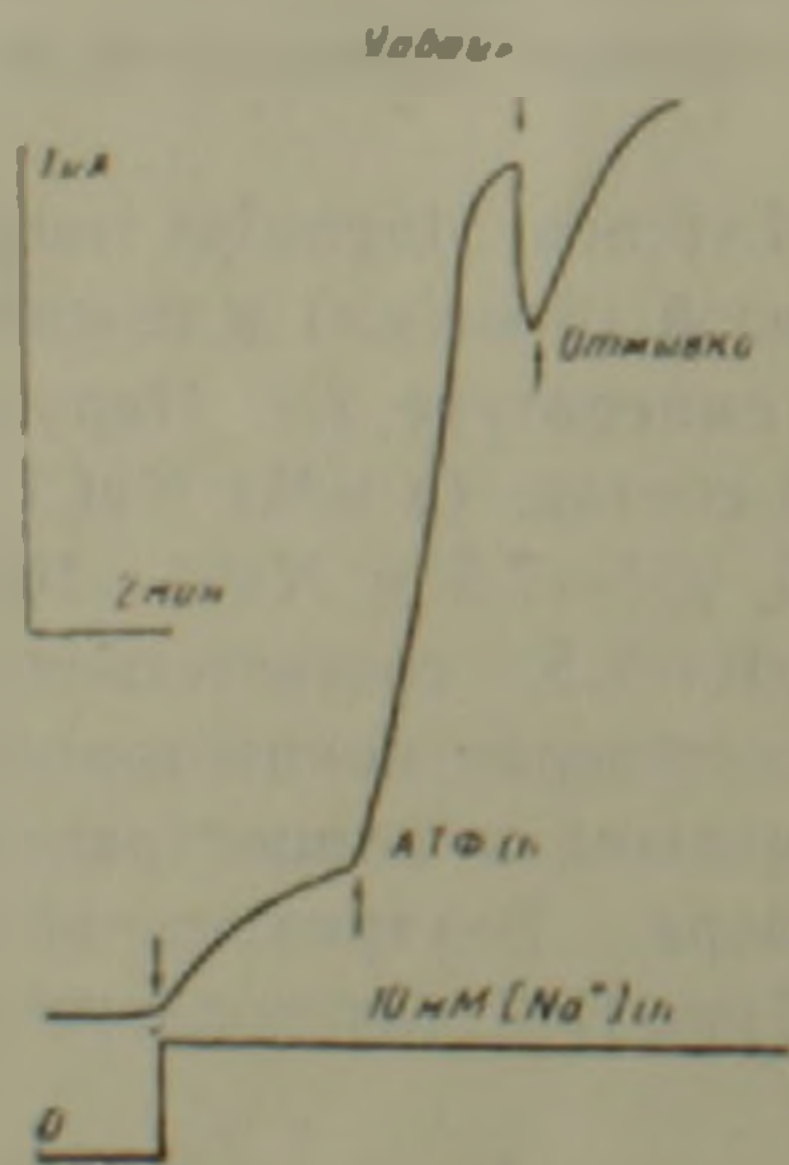


Рис. 1. Выходящий ток, обусловленный активацией электрогенного натриевого насоса путем введения во внутриклеточную среду 10 мМ натрия и 1 мМ АТФ. Уабанин в концентрации 2×10^{-4} М обратимо ингибирует этот ток.

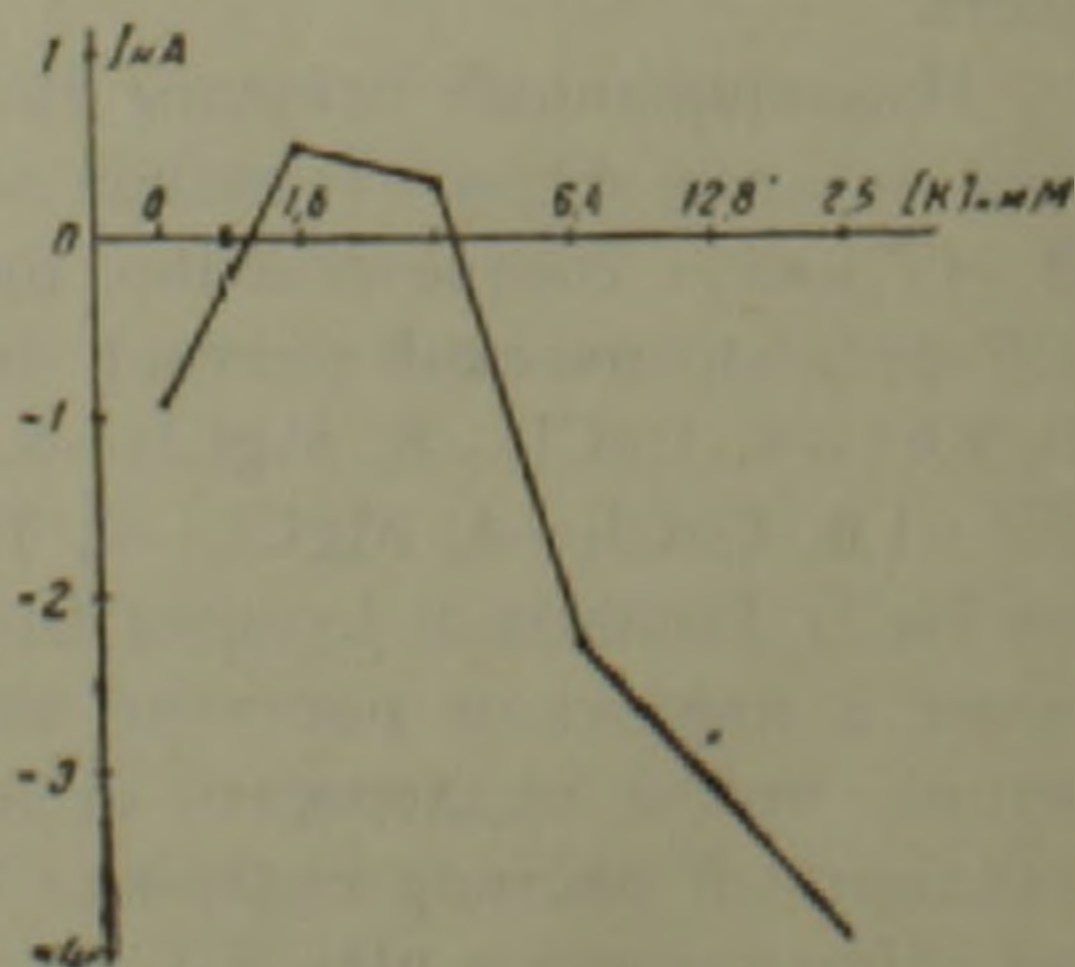


Рис. 2. Зависимость трансмембранных токов в диализируемом нейроне *Lymaea stagnalis* от наружной концентрации ионов калия.

мых нейронах. Кривая зависимости калий-вызванного тока от его концентрации в среде имеет характерную форму: в диапазоне 1—3 мМ мембранный ток имеет выходящее направление, а при более низких и высоких концентрациях—входящее.

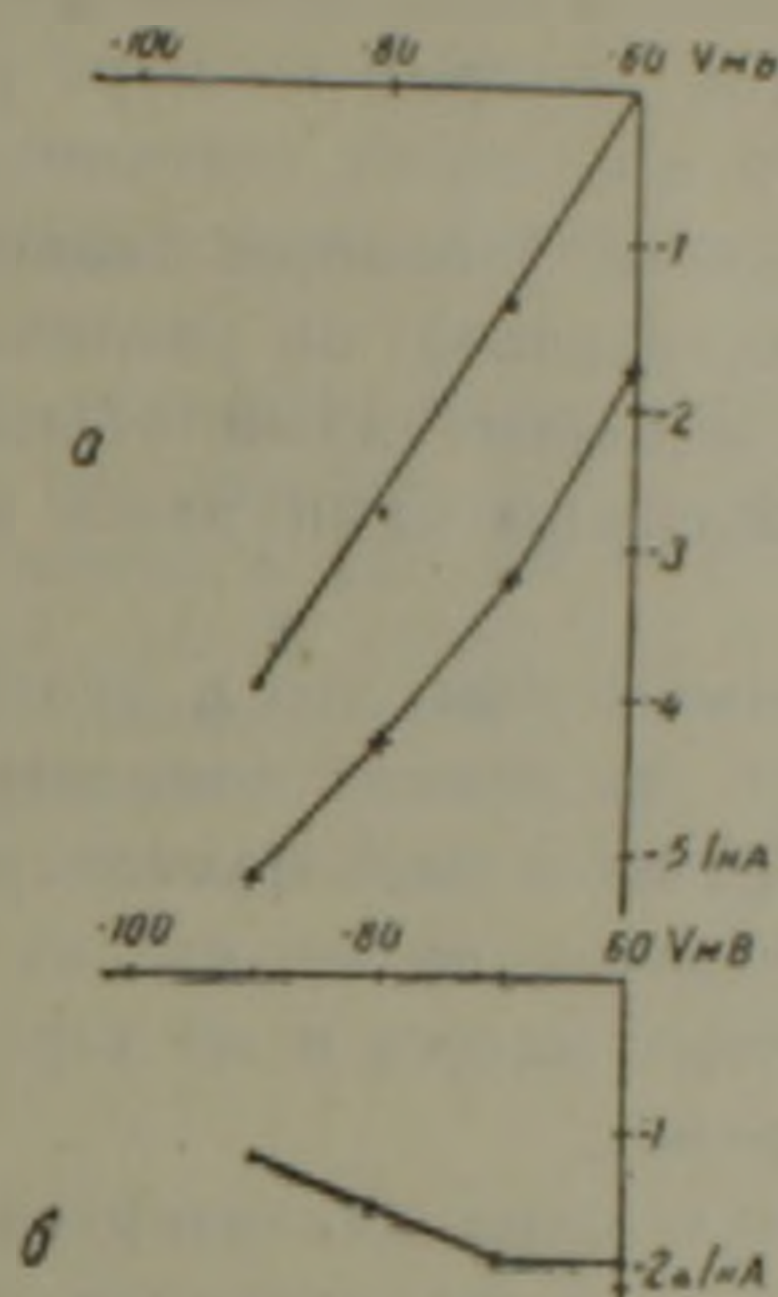


Рис. 3. а—вольт-амперные характеристики анализируемого нейрона *Helix Pomatia* в нормальном физиологическом растворе (•), и в присутствии 2×10^{-4} М уабина (+); б—выходящий ток, вызванный действием уабина. Полученный вычитанием кривой (2) из (1) на верхнем рисунке

Поскольку, температура среды определяет скорость химической реакции, она является одним из главных факторов, контролирующих работу катионного насоса. Ее понижение или повышение вызывает соответственное подавление или усиление активного транспорта ионов натрия и калия через мембрану. При этом, существенно не меняется транс-мембранный пассивный транспорт указанных ионов (⁴). Чтобы установить природу (активную или пассивную) АТФ-зависимого выходящего тока исследовали его зависимость от температуры среды. Понижение температуры с 20° до 4°С приводило к появлению входящего трансмембранного тока. На холоду удаление ионов калия из среды вызвало вместо входящего тока, который обычно мы наблюдали при условиях нормальной работы натриевого насоса (см. рис. 2), выходящий ток, обусловленный увеличением калиевого равновесного потенциала на мембране. Эти данные также являются качественными повторениями данных, полученных нами ранее на целостных нейронах (⁴).

Костюком и сотр. было показано, что насосный ток в гигантских нейронах улитки является потенциалзависимым: при увеличении мем-

бранного потенциала насосный ток подавляется (⁷). Чтобы выяснить, является ли насосный ток потенциалозависимым и в случае диализируемого нейрона, мы исследовали вольт-амперные характеристики мембраны в нормальном физиологическом растворе в присутствии и отсутствии убаина (рис. 3), а также в бескальевом растворе. В обоих случаях появляется входящий ток, который по мере увеличения мембранного потенциала уменьшается и не имеет потенциала реверсии до 90—100 мв. Входящий ток, вызванный убаином, зависит и от поддерживаемого уровня мембранного потенциала: он увеличивается при понижении последнего и наоборот, экспоненциально убывает при его повышении. Аналогичные данные получены нами ранее на целостном нейроне (⁸).

Приведенные выше данные о том, что в диализируемых нейронах входящий ток возрастает при увеличении концентрации натрия и АТФ с внутренней стороны мембраны и блокируется убаином, холодом и бескальевым раствором, указывает на то, что он обусловлен работой электрогенного натрий-кальевого насоса и по характеру не отличается от такового в целостных нейронах.

Таким образом, внутриклеточно диализируемый нейрон может быть использован как модель для исследования активного транспорта веществ через мембрану нервной клетки в условиях, позволяющих контролировать состав внутриклеточной среды.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР
Институт биологической физики
Академии наук СССР

Ա. Ռ. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Ս. Ն. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ն. Կ. ՉԵՄԵՐԻՍ

Դիալիզոված նեյրոնը ինչպես նոր մոդել էլեկտրոգեն նատրիումական պոմպի ուսումնասիրման համար

Ուսումնասիրվել է էլեկտրոգեն նատրիումական պոմպի առկայությունը և նրա հատկությունները խիտունչի դիալիզոված նեյրոնի մեջ: Վերջինիս մոտ ներքջային նատրիումական իոնների և ԱՏՖ-ի համակցված ավելացումը մեմբրանային լարման ֆիքսացիայի պայմաններում առաջ է բերում հիպերպոլյարիզացիոն հոսանք, որը ճնշվում է ուաբաինի կողմից: Այդ հոսանքը որոշ հատկություններով նմանվում է ամրողչական բջիջների վրա ստացած նատրիումական պոմպով պայմանավորված տրանսմեմբրանային հոսանքին. նա նրնշվում է միջավայրի ջերմաստիճանի իջեցումից և արտաքին միջավայրից կալիումի իոնների հեռացումով:

Ներքջային նատրիումով և ԱՏՖ-ով պայմանավորված հոսանքի մեծությունը կախված է մեմբրանային պոտենցիալի մեծությունից: Վերջինիս

բարձրացումը ճնշում, իսկ ցածրացումը ուժեղացնում է այդ հոսանքի ուժը:

Այս տվյալները թույլ են տալիս մեզ առաջարկելու խիստինչի դիալիզված էնյրոնը որպես նոր մոդել նատրիումական պոմպի ուսումնասիրման համար, որը հնարավորություն է տալիս հետազոտողին կամավոր ձևով փոխելու ներ-բջջային միջավայրը:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal „Nature“, v. 257, 691 (1975) ² P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal J. physiol., 270, 545—568 (1977). ³ М. А. Костенко, Б. Н. Венрицса, в кн. Биопизика живой клетки, 3, 132—137 (1972). ⁴ G. A. Kerkut R. G. Thomas, Compar. Biochem. Physiol. 14, 167 (1965) ⁵ С. Н. Айрапетян, „Биопизика“, № 6, 1969. ⁶ С. Н. Айрапетян „Биопизика“ № 4, 1969. ⁷ P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal, V. J. Pidoplichko, J. Physiol 226, 373—392(1972). ⁸ А. Р. Акопян, С. Н. Айрапетян, В. Н. Казаченко, Тезисы докладов, Всесоюзный симпозиум по транспортным АТФаз, Тбилиси, 1978.