

УДК 577.352.5:612.822

БИОХИМИЯ

С. Н. ААрапетян, М. А. Сулейманян,
 А. М. Геворкян, Г. М. Аракелов

Набухание как защитная реакция клетки

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 3/IV 1980)

Клиническими исследованиями было показано, что при отравлении метаболическими ядами и при аноксии у человека наблюдается набухание мозговых клеток (¹). Наряду с этим, предыдущими нашими опытами было показано, что в клетках катионный насос является основным метаболическим механизмом, с помощью которого клетка регулирует свой объем (²). Обратная же связь—зависимость активности натриевого насоса от объема клетки остается мало изученной, а имеющиеся литературные данные носят весьма противоречивый характер. Обычно для исследования зависимости активности натриевого насоса от объема клетки изучается его активность в гипо- и гипертонических растворах, так как клетки ведут себя как своего рода осмометры (³).

Кейнс, исследуя зависимость активности натриевого насоса от тоничности окружающей среды, обнаружил, что в портняжных мышцах лягушки повышение тоничности среды вызывает активацию натриевого насоса (⁴). На этих же объектах Муллинс и Авад не обнаружили статистически достоверного изменения активности натриевого насоса при повышении тоничности наружного раствора (⁵), тогда как Веноза показал, что гипотонический раствор имеет стимулирующий эффект на работу натриевого насоса (⁶).

Выяснение природы обратной связи между объемом клетки и активностью натриевого насоса позволит выяснить физиологическое значение насос-вызванного изменения объема клетки в ее нормальной жизнедеятельности. Изучению данного вопроса и посвящена настоящая работа.

Опыты проводили на изолированных нервных ганглиях виноградной улитки в летние месяцы. Исследуемые ганглии предварительно инкубировали в течение трех часов в холодном бескальциевом рингеровском растворе, где 50% натрия было в виде изотопа ²⁴Na. Для

удаления из внеклеточной среды ионов натрия ганглии после их насыщения ионами натрия помещали в бескальцевый, безнатриевый холодный изотонический раствор Рингера в течение 30 мин. В предыдущей нашей работе было показано, что за 30 мин пребывания ганглий в указанной безнатриевой среде выходит весь внеклеточный натрий (7). Затем исследовали выход изотона натрия в наружную среду с различной тоничностью в условиях комнатной температуры. Методики изоляции одиночных нейронов и измерение насосного трансмембранного тока в условиях фиксации напряжения на мембране были описаны ранее (2), (8).

Исходный рингеровский раствор имел следующий состав в миллимолях: Na^+ —80, K^+ —4, Ca^{++} —7, Mg^{++} —13, трис- HCl (pH —7,5)—10, глюкоза—10. Для того чтобы при изменении тоничности растворов их ионный состав держался постоянным, в исходном растворе Рингера половину NaCl заменяли осмотически эквивалентным количеством сахарозы, а осмотичность растворов варьировали изменением содержания в ней сахарозы. Оубаинсодержащий раствор Рингера приготовили непосредственно перед опытом.

На рис. 1 показана зависимость объема изолированного нейрона улитки от тоничности окружающей среды. Как явствует из этого

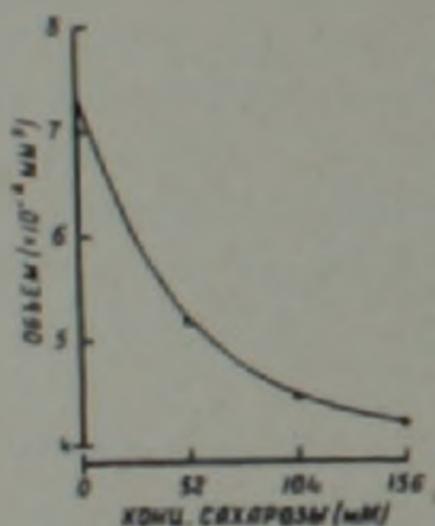


Рис. 1. Изменение объема клетки в зависимости от тоничности окружающей среды

рисунка, по мере увеличения тоничности среды уменьшается объем нейрона и эта зависимость особенно четко проявляется в диапазоне концентрации сахарозы 0—104 ммоль, а при дальнейшем повышении ее концентрации объем нейрона уменьшается незначительно.

Известно, что в условиях бескальцевого раствора, в результате подавления натриевого насоса, клетки обедняются ионами калия и обогащаются ионами натрия. Инкубация нейронов виноградной улитки в условиях бескальцевого раствора в течение трех часов приводит к повышению внутриклеточного содержания натрия на 50—60 ммоль/л внутриклеточной воды, тогда как в норме он составляет всего 7—10 ммоль/л (7). После перенесения натрийобогащенных нейронов в нормальный, калийсодержащий раствор происходит интенсивная потеря избыточного содержания внутриклеточного натрия и реаккумуляция

ионов калия, которая сопровождается увеличением электрического потенциала мембраны (т. е. происходит восстановление исходного внутриклеточного катионного гомеостаза в результате активации электрогенного натриевого насоса) (2).

Чтобы выяснить характер зависимости работы электрогенного натриевого насоса от величины поверхности нейрона, исследовали насос-вызванный трансмембранный ток в условиях различных тоничностей

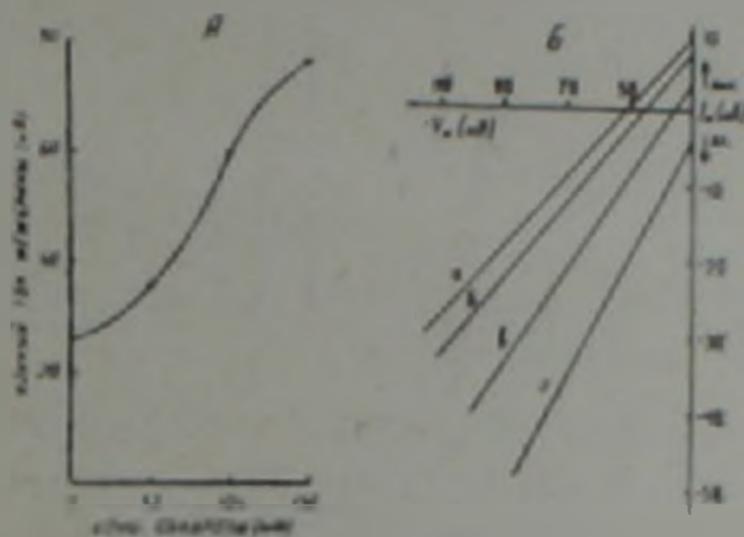


Рис. 2. А—Зависимость насос-вызванного трансмембранного тока от тоничности окружающей среды. Б—Вольт-амперные характеристики мембраны этого же нейрона при различных осмотических давлениях и при различных содержаниях сахарозы в окружающей среде: а—156 мМ, б—104 мМ, в—52 мМ; г—в бессахарозном растворе

восстановительных растворов. Как видно на рис. 2, А, при фиксации напряжения на мембране насосный ток возрастает по мере увеличения тоничности окружающей среды. Причина такого повышения электрогенности натриевого насоса может быть обусловлена либо повышением омического сопротивления мембраны, либо активацией выхода ионов натрия из клетки, либо обоими факторами. Из рис. 2, Б видно, что при увеличении осмотического давления мембранный потенциал увеличивался с 25 мВ в бессахарозном растворе до 50 мВ, когда в среде присутствовало 156 ммоль сахарозы. Когда концентрация сахарозы в среде была 52 и 104 ммоль, мембранный потенциал был равен соответственно 36 и 45 мВ. Если бы при увеличении тоничности среды величина насосного тока не увеличивалась, то гиперполяризация мембраны, обусловленной только увеличением ее сопротивления, была бы равной рассчитанной по закону Ома от изменения сопротивления. Производя простой расчет, из рис. 2, Б можно убедиться, что действительно в создании гиперполяризации мембраны в гиперрастворах участвуют активация электрогенного натриевого насоса, увеличение сопротивления мембраны и увеличение внутриклеточных концентраций ионов калия и натрия. Однако совершенно иной результат получается при измерении активности выхода изотопа ^{22}Na из клетки в гипо- и гипертонических растворах. На рис. 3 А показаны результаты наших экспериментов. Из рисунка четко видно, что при увеличении осмотического давления наружной среды активности вы-

хода изотопа ^{22}Na из клетки уменьшается, т. е. получаются радикально обратные данные, чем при фиксации напряжения на мембране.

Таким образом, представленные данные показывают, что в зависимости от условий инкубации можно получить и активацию и инактивацию электрогенного натриевого насоса при повышении тоничности

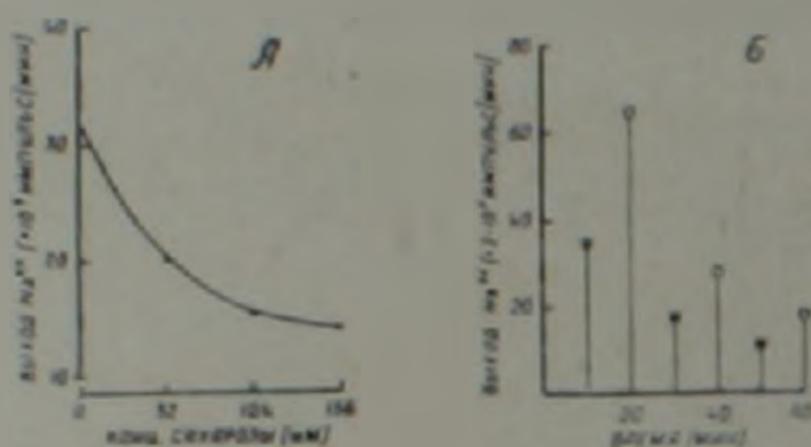


Рис. 3 Зависимость активного выхода изотопа ^{22}Na из клеток от тоничности окружающей среды (А) и от времени (Б)

окружающей среды. По-видимому, в этом явлении решающую роль играет внутриклеточная концентрация ионов натрия. Трехчасовая инкубация нейронов в бескальциевом холодном растворе настолько увеличивает внутриклеточную концентрацию натрия, что происходит насыщение транспортного механизма, дальнейшее повышение концентрации натрия в клетке путем увеличения тоничности окружающей среды уже не ускоряет процесс активного транспорта ионов и решающим фактором в выходе ионов ^{22}Na из нейронов становится уменьшение насосных единиц в мембране при повышении тоничности окружающей среды. Именно этим и можно объяснить расхождение между экспериментальными данными Кейнеса, Муллинса и Авада с одной стороны и Венозы—с другой, поскольку в указанных трех работах было исследовано действие гипотонического раствора на активность натриевого насоса у мышц с различными исходными содержаниями внутриклеточного натрия. Об этом свидетельствуют и данные о зависимости скорости выхода ^{22}Na от времени. Как видно из рис. 3, Б, по мере уменьшения скорости работы натриевого насоса со временем уменьшается эффект разбавления среды на работу натриевого насоса, т. е. по мере уменьшения внутриклеточного содержания натрия исчезает эффект гипотонического раствора на насос.

Так как гипотонический раствор имел активационное действие на скорость выхода ^{22}Na из клеток при насыщенном состоянии электрогенного натриевого насоса, то предполагалось, что при набухании нейрона, возможно, открываются новые оубабиновые рецепторы (насосные единицы) на мембране, которые до этого находились в экранированном состоянии. Опыты, проведенные с оубабином, подтвердили данное предположение. Из таблицы видно, что инактивационное действие оубабина на активный выход ионов натрия в среду, которое имело место в изотоническом растворе, полностью исчезает в

сильно гипертоническом растворе и, наоборот, увеличивается в гипотоническом растворе. Аналогичные данные были получены недавно с ацетилхолиновыми рецепторами в нашей лаборатории (10). Число

Зависимость действия оубаина на активный выход изотопы ^{22}Na из клеток от тоничности восстановительного раствора

Восстановительный раствор	Число импульсов в минуту	Средняя квадратичная ошибка
Нормальный раствор Рингера	12031	± 450
Нормальный раствор Рингера, содержащий $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ оубаина	7650	± 830
Гипертонический раствор	3134	± 230
Гипертонический раствор, содержащий $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ оубаина	3207	± 240

ацетилхолиновых рецепторов на мембране увеличивалось в гипотоническом растворе и уменьшалось в гипертоническом. Работами ряда авторов было показано, что в период инкубации клеток в бескальневых растворах увеличивается число насосных единиц на мембране (11). Этот факт авторы объясняли усилением синтеза новых насосных единиц в мембране. Полученные в настоящей работе данные позволяют думать, что появление новых насосных единиц в мембране не является результатом усиления их синтеза, как это принято считать, а является следствием набухания клетки в результате инактивации натриевого насоса из-за отсутствия ионов калия в среде.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Մ. Ա. ՍՈՒՐԵՑՄԱՆՅԱՆ, Ս. Ն. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ, Հ. Մ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Գ. Մ. ԱՌԱԿԵԼՈՎ

Բջջի ուռչելի ուղղելու պաշտպանողական ունակցիա

Ուսումնասիրվել է բջջի ծավալի փոփոխության և էլեկտրոգեն նատրիումական պոմպի ակտիվության միջև գոյություն ունեցող հակադարձ կապի բնույթը: Ցույց է տրվել, որ մեմբրանի լարման ֆիզսացիայի պայմաններում բջջի արտաքին միջավայրի օսմոտիկ ճնշման մեծացումը բերում է տրանսմեմբրանային իոնային հոսանքի մեծացման: Միանգամայն հակառակ էֆեկտն է ստացվում իզոտոպային մեթոդի դեպքում, երբ զնահատվում է նատրիումի իոնների ակտիվ ելքը նեյրոններից կալիումից դուրկ. սառը ֆիզիոլոգիական յուծույթում երկարատև (3 ժամ և ավելի) ինկուբացիայից հետո Այս տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնելու, որ բջջի ծավալի փոքրացումը մի կողմից բերում է նատրիումական պոմպի աշխատանքի արագացման այդ իոն-

ների ներքջային կոնցենտրացիայի մեծացման հետևանքով, մյուս կողմից նատրիումական պոմպի ճնշման—մեմբրանում գոյություն ունեցող պոմպային միավորների թվի փոքրացման հետևանքով:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ H. V. Wheal, N. M. Horn, G. M. Austin. *Comp Biochem. Physiol.*, vol. 57C, (1977). ² S. N. Ayrapetyan, M. A. Sulejmanian, *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 61A, (1979). ³ X. Ност, в кн.: Физиология клетки, „Мир“, М., 1975. ⁴ R. D. Keynes, *J. Physiol.*, vol. 178 (1965). ⁵ L. I. Mullins, M. Z. Awad, *J. Gen. Physiol.*, vol. 48, (1965). ⁶ R. A. Venosa, *Biochim et Biochys Acta*, vol. 510 (1978). ⁷ А. М. Геворкян, С. Н. Адраниетян, ДАН Арм. ССР, т. 68, №5 (1979). ⁸ М. А. Сулейманян, ДАН Арм. ССР, т. 68, № 5 (1979). ⁹ S. N. Ayrapetyan, *Neurobiology of Invertebrates*, Tihany, 1976. ¹⁰ S. N. Ayrapetyan, V. L. Arvanou, *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 64 A. ¹¹ P. P. Baker, I. S. Willis, *J. Physiol.*, vol. 224 (1972).