

УДК 591.182+577.352

БИОФИЗИКА

В. Л. Арванов, М. А. Сулейманиян, С. Б. Мажинян, С. Н. Айрапетян

О действии убаина на процессы взаимодействия АТФ
с наружной стороной нейрональной мембраны

(Представлено академиком АН Армянской ССР В. В. Фанарджяном 4/VII 1983)

В настоящее время установлено, что аденозинтрифосфат (АТФ) является не только основным источником энергии в биологических системах, но может выступать и в роли как медиатора нервной системы, так и модулятора синаптических процессов (¹⁻⁴). Известно, что нервные клетки улитки могут служить хорошей моделью для фармакологических исследований (⁵). В нашей предыдущей работе (⁶) было показано, что убаин—специфический ингибитор Na, K-АТФазы мембраны блокирует АХ-вызванные токи перфузированного изнутри нейрона путем подавления процесса связывания АХ с рецепторами мембраны. Поэтому представляло также интерес исследование действия убаина на процессы взаимодействия АТФ с нейрональной мембраной для более глубокого понимания медиаторной роли АТФ и механизмов функциональной корреляции между системой Na, K-АТФазы мембраны и ее рецепторными свойствами.

Опыты проводились с помощью электрофизиологической и изотопной методик. Потенциометрическое исследование АТФ-вызванных трансмембранных токов проводилось с помощью методики фиксации напряжения и внутриклеточной перфузии гигантских нейронов улитки *Helix*. Предыдущими нашими работами (⁶) было установлено, что внутриклеточно-перфузированные нейроны являются удобной моделью для изучения хеморецептивных свойств нейрональной мембраны. Для исследования процесса связывания радиоактивных молекул АТФ с мембраной нервные ганглии улитки инкубировали в течение 20 мин в 3 мл наружного раствора, содержащего 10^{-5} М немеченого и 30 мкКи меченого α^{32} -АТФ (фирма «Amersham»). Затем, после двукратного промывания холодным рингеровским раствором, содержащим 10^{-5} М «холодного» АТФ, ганглии растворяли в 2 мл растворителя «протозол» (фирма «New England Nucl. Corp.») при 45°, добавляли сцинтилятор Брея (⁷) и считали количество связанных радиоактивных молекул АТФ в ганглиях на сцинтиляционном спектрометре СЛ-4221 (фирма «Intertecnlque»).

В настоящее время известно, что мембранные рецепторы, взаимодействующие с медиатором, располагаются обычно на наружной стороне нейрональной мембраны и в большинстве случаев ионофоретическое введение медиаторов внутрь клетки не вызывает генерации специфического ответа мембраны, реализующегося при наружной аппли-

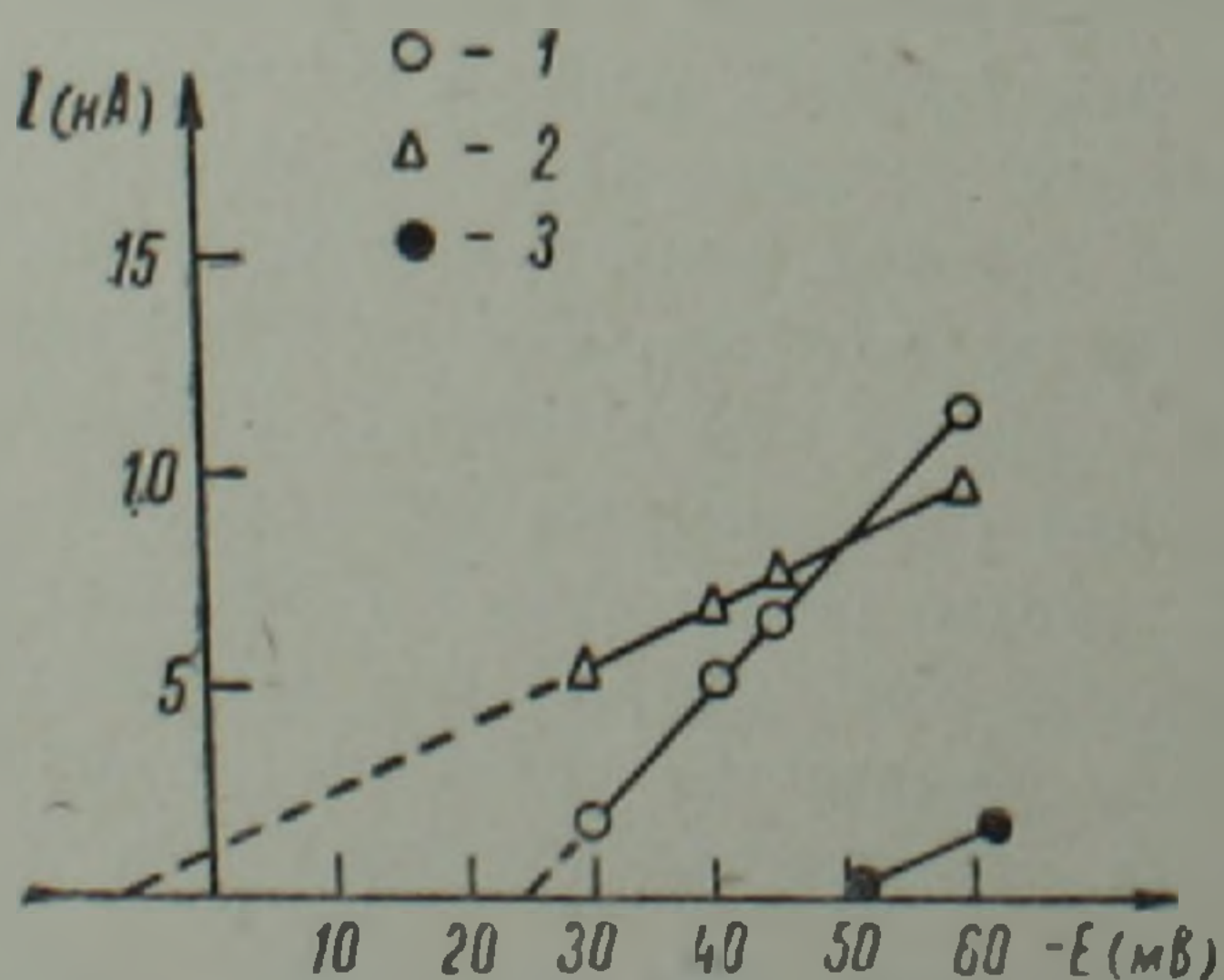
кации медиатора (⁸). Для того чтобы выяснить, обусловлено ли действие АТФ на нейрональную мембрану его взаимодействием с определенными мембранными рецепторами или же оно неспецифично, было изучено действие АТФ с наружной и с внутренней сторон мембраны на трансмембранные токи перфузированного нейрона.

В предыдущей работе (⁶) нами было идентифицировано два типа нейронов, различающихся ионными механизмами генерации АХ-ответов и их чувствительностью к убаину. АХ-ответы у нейронов типа А обуславливались АХ-вызванными увеличениями мембранной проницаемости для ионов Na^+ и Cl^- и блокировались убаином. Генерация АХ-ответов нейронов типа Б реализовалась за счет увеличения мембранной проницаемости для ионов Na^+ и K^+ , и они были нечувствительны к убаину.

Исследование действия АТФ с наружной стороны мембраны показало, что в случае нейронов типа А $5 \cdot 10^{-5}$ М АТФ (рисунок) вызывал ток входящего направления, тогда как у нейронов типа Б генерация АТФ-вызванного входящего тока не наблюдалась, даже при увеличении концентрации апплицированного АТФ до 10^{-3} М. Непосредственное добавление аналогичной концентрации АТФ во внутриклеточный перфузат нейрона типа А не вызывало генерации ответов мембраны, которые развивались при добавлении АТФ с наружной стороны мембраны этого же нейрона.

Графически рассчитанный на рисунке равновесный потенциал (E_p) для АТФ-вызванных ответов мембраны соответствовал—23 мв.

Для того чтобы выяснить роль ионов Cl^- в генерации АТФ-вызванных токов мембраны типа А, была изучена зависимость вольт-амперных характеристик АТФ-вызванных ответов от градиента ионов Cl^- на мембране. Как видно из рисунка, уменьшение в 2 раза концентрации ионов Cl^- в наружном растворе путем замещения ионов Cl^- соответствующими концентрациями ацетата, приводило к сдвигу E_p для АТФ-вызванных ответов мембраны на величины, близкие к теоретически (⁹) рассчитанным, так же, как было ранее показано (⁶), и для АХ-ответов типа А.



Вольт-амперные характеристики для АТФ-вызванных трансмембранных токов: 1—в условии нормального омывающего раствора; 2—при замещении 50% ионов Cl^- в растворе на ацетат; 3—под действием убаина

Полученные данные позволяют предположить, что в основе реализации АТФ-вызванных ответов мембраны у нейронов типа А лежит увеличение мембранной проницаемости для Cl^- . В случае нейронов типа Б, где под действием АХ не обнаруживается изменение мембранной проницаемости для Cl^- , АТФ не продуцировал генерации ответов.

Таким образом, вышеприведенные электрофизиологические данные указывают на возможность АТФ связываться со специфическими участками на нейрональной мембране и продуцировать генерацию электрического ответа.

Как было ранее установлено (^{6,10}), убаин подавляет именно те ответы мембраны на действие АХ и ГАМК, которые обуславливаются увеличением мембранной проницаемости для Cl^- , и не действует на ответы мембраны, в реализации которых хлор участия не принимал. В связи с этим было интересно выяснить механизм действия убаина на АТФ-вызванные ответы мембраны.

Как видно на рисунке, 10^{-4} М убаин почти полностью подавлял АТФ-вызванные ответы мембраны, обусловленные увеличением мембранной проницаемости для Cl^- . Следовательно, можно предположить, что убаин подавляет ответы мембраны, которые обусловлены активацией различными медиаторами (в том числе АТФ) именно Cl^- -каналов мембраны, и не действует на ответы, в реализации которых Cl^- участия не принимает.

Полученные данные говорят в пользу гипотезы Карпентера (¹¹), согласно которой различные связывающие участки (рецепторы) на мембране для различных нейротрансмиттеров могут комбинироваться с одним из трех ионофоров (Na, K и Cl), через которые реализуется поток ионов.

В наших предыдущих работах (¹²) было показано наличие «резервных» хеморецепторов на нейрональной мембране, которые находились в экранированном состоянии в условиях активной работы электрогенного натриевого насоса и обнажались для взаимодействия с медиатором при набухании нейрона, обусловленном как инактивацией натриевого насоса, так и действием гипотонического раствора. Если предположить, что АТФ является медиатором и связывается со специфическими участками нейрональной мембраны, то, очевидно, следует ожидать открывания новых участков для связывания АТФ в гипотоническом растворе, которые до этого находились в «экранированном» состоянии. Ввиду сказанного представляло интерес исследовать зависимость количества связанного с мембраной меченого АТФ от активности электрогенного натриевого насоса и от тоничности окружающего раствора (осмотичность раствора варьировали изменением содержания сахарозы в нем). Как видно из таблицы, по мере увеличения тоничности раствора уменьшается число связанных молекул АТФ с мембранами и, наоборот, увеличивается их число в гипотоническом растворе, как это имело место при действии таких синаптических медиаторов, как АХ и ГАМК.

Аналогичное увеличение связанного с мембраной АТФ, вызван-

Действие убаина, ацетилхолина и тоничности раствора на процесс
связывания АТФ с мембранами клеток ганглиозной массы улитки
($\times 10^9$ молекул/мг влажного веса)

Инкубационная среда	Количество связанного с мембраной АТФ
Нормальный рингеровский раствор	24404,0 $\pm$ 403,6
Гипотонический раствор	42786,5 $\pm$ 908,8
Изотонический раствор	29131,0 $\pm$ 430,1
Гипертонический раствор	12582,0 $\pm$ 313,8
АХ-содержащий раствор рингера	2908, $\pm$ 98,9
Убаинсодержащий раствор рингера	6604,0 $\pm$ 217,5
	n=5

ное гипотоническим раствором, следовало бы ожидать и под действием убаина и АХ, которые так же как и гипотонический раствор вызывают набухание нейрона (¹³). Однако, как явствуют данные таблицы, в отличие от гипотонического раствора и АХ, и убаин вызывали значительное подавление связывания меченого АТФ с мембранами клеток ганглиозной массы улитки. Эти данные указывают на наличие близкой функциональной корреляции между участками для связывания АТФ на мембране с системой мембранных холинорецепторов и с Na, K-АТФазой мембраны.

К сожалению, используемая в настоящей работе изотопная методика не позволяла определить, какая часть молекул АТФ связывается с мембраной и какая часть проникает внутрь клетки. Однако известно, что, как правило, АХ увеличивает проницаемость мембраны для ионов и, следовательно, утилизацию АТФ в клетке. Но полученные данные об уменьшении количества взаимодействующих молекул АТФ с клетками в АХ и убаинсодержащем растворах указывают, что α^{32} -АТФ связывается с мембраной, хотя эти данные не исключают возможность частичного проникновения молекул АТФ в клетки.

Резюмируя вышеприведенные данные, можно предположить, что АТФ может выполнять роль медиатора ЦНС у улитки, связываясь с определенными рецепторами мембраны и вызывая увеличение мембранной проницаемости для Cl^- . С другой стороны, полученные данные о подавляющем действии убаина на АТФ-вызванные трансмембранные токи и на связывание меченого АТФ с мембраной служат еще одним доводом в пользу ранее высказанной гипотезы о том, что одна и та же макромолекула, локализованная в мембране, может выполнять функцию и рецептора, и Na, K-АТФазы или они имеют общую субъединицу (⁶).

Однако для выяснения механизма, лежащего в основе взаимодействия АТФ с наружной стороны нейрональной мембраны и его функциональной корреляции с системами холинорецепторов и Na, K-АТФазы мембраны, требуется более детальное исследование.

Ուաբայինի ազդեցությունը ԱԵՖ-ի արտամեմբրանային կապվածության վրա

ԱԵՖ-ի մեղիատորային դերը պարզելու համար ուսումնասիրվել է ԱԵՖ-ի ազդեցությունը խիտունջի հսկա նեյրոնների տրանսմեմբրանային հոսանքների վրա: Ուսումնասիրվել է նաև նշված α^{32} -ԱԵՖ մոլեկուլների կապվածությունը թաղանթի հետ:

$5 \cdot 10^{-5}$ մոլ ԱԵՖ-ի ներկայությունը արտաքին միջավայրում առաջացնում է քլոր իոնների թափանցելիության մեծացում, որի հետևանքով առաջանում է ներս մտնող ուղղությամբ տրանսմեմբրանային հոսանք, որը ճնշվում է ուաբայինով:

α^{32} -ԱԵՖ-ի կապվածությունը թաղանթի հետ մեծանում է հիպոտոնիկ և փոքրանում է հիպերտոնիկ լուծույթներում և ճնշվում է ինչպես աղետիլիտ-լինով այնպես էլ ուաբայինով:

Ենթադրվում է, որ ԱԵՖ-ը կատարում է խիտունջի կենտրոնական ներվային համակարգում մեղիատորի դեր:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ G. Burnstock, *Newroscience*, v. 1, p. 239—248 (1976). ² M. J. Dowdall, A. F. Boyne, V. P. Whittaker, *Biochem. J.*, v. 140, p. 1—12 (1974). ³ Т. Г. Пытунцева, Т. М. Турнаев, *ДАН СССР*, т. 129, с. 1442—1444 (1959). ⁴ E. M. Sillinsky, *J. Physiol.*, v. 247, p. 145—162 (1975). ⁵ G. A. Kerkut, R. M. Pittman, R. J. Walker, *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 31, p. 611—633 (1969). ⁶ В. Л. Арванов, С. Н. Айрапетян, *ДАН СССР*, т. 251, с. 222—225 (1980). ⁷ G. A. Bray, *Anal. Biochem.*, v. 1, p. 279—281 (1966). ⁸ H. P. Rang, *Quart. Rev. Biophys.*, v. 7, p. 283—399 (1974). ⁹ A. Takenchi, N. Takenchi, *J. Physiol.*, v. 154, p. 52—67 (1960). ¹⁰ С. Н. Айрапетян, С. С. Дадалян, Г. А. Геворкян, *ДАН СССР*, т. 262, с. 1007—1010 (1982). ¹¹ D. O. Carpenter, J. W. Swann, P. J. Jarowski, *J. Neurobiol.*, v. 8, p. 119—132 (1977). ¹² S. N. Ayrapetyan, V. L. Arvanov, *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 64A, p. 601—604 (1979). ¹³ S. N. Ayrapetyan, M. A. Suleimanyan, *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 64A, p. 571—575 (1979).