

6/6.2/3  
рчб9

# Рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД

# Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach

Editors

Ralph W. Straub, M.D.

*Professor and Chairman  
Department of Pharmacology  
University of Geneva  
Geneva, Switzerland*

Liana Bolis, M.D.

*Professor and Chairman  
Department of General Physiology  
University of Messina  
Messina, Italy*

Raven Press ■ New York

# Рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов:

615.2/3  
p459

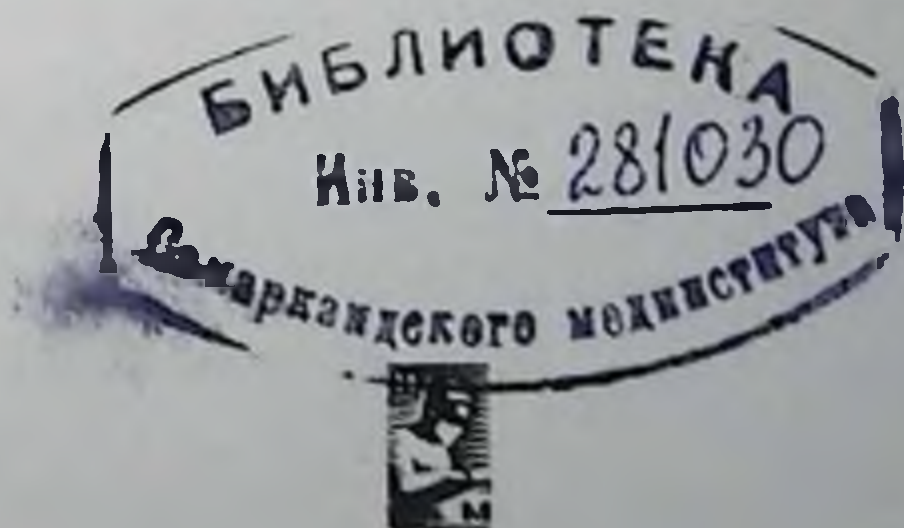
## МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД

Под редакцией

доктора РАЛЬФА У. ШТРАУБА, профессора  
и руководителя отдела фармакологии  
Университета Женевы, Женева, Швейцария

доктора ЛИАНЫ БОЛИС, профессора  
и руководителя отдела общей физиологии  
Университета Мессины, Мессина, Италия

Перевод с английского  
доктора химических наук В. П. ТОРЧИЛИНА



Москва • «Медицина» • 1983

УДК 615.2/3.015.44

Рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов: междисциплинарный подход: Пер. с англ./Под ред. Р. У. СТРАУБА, Л. БОЛИС.—М.: Медицина, 1983, 368, с., ил.

**Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach.** Editors RALPH W. STRAUB, LIANA BOLIS. Raven Press, New York, 1978.

Книга представляет собой изложение междисциплинарного подхода к крайне важной и актуальной научной проблеме современной биохимии и медицины — взаимодействию рецепторов клеточных мембран с различными веществами, влиянию этого взаимодействия на свойства мембран и общеприродному значению данного процесса. Специальные разделы посвящены проблемам изучения мембранной структуры и распознавания рецепторов, кинетике связывания лекарств с рецепторами, изучению рецепторов нейротрансмиттеров, процессам рецепции гормонов, роли рецепторов лекарств и токсинов в проницаемости клеточных мембран, транспорту вещества через биологические мембраны.

Для биохимиков, биологов и медиков, занимающихся проблемами мембран и рецепции.

В книге 145 рис., 32 табл., список литературы — 1041 название.

Р  $\frac{2001040000-144}{039(01)-83}$  3-83

© 1978 by Raven Press Books, Ltd.

© Перевод на русский язык. Издательство «Медицина», 1983

## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие

### СТРУКТУРА МЕМБРАН И ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

- Некоторые соображения о структуре и функции стеринной молекулы.  
*Конрад Блох (Konrad Bloch)* 10
- Плазматическая мембрана лимфоцитов: структура внутренней поверхности и трансмембранные белки.  
*Франк С. Уолш, Брайан Х. Барбер Мишель Дж. Крамптон (Frank S. Walsh, Brian H. Barber, Michael J. Crumpton)* 18
- Подход иммунологов к изучению рецепторов клеточных мембран.  
*Дж. Дж. В. Носсаль (G. J. V. Nossal)* 32

### КИНЕТИКА СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВ С РЕЦЕПТОРАМИ

- Мембранный шум: метод исследования рецепторов лекарств.  
*Д. Колкахаун (D. Colquhoun)* 40

### РЕЦЕПТОРЫ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ

- Ультраструктура ацетилхолиновых рецепторов в нервно-мышечном соединении у млекопитающих.  
*Джон Н. Раш, К. Сью Хадсан, Марк Х. Эллисман (John E. Rash, C. Sue Hudson, Mark H. Ellisman)* 59
- Физиология мускариновых рецепторов ацетилхолина.  
*Роберт Д. Пурвес (Robert D. Purves)* 82
- Влияние ацетилхолина и его аналогов на выход фосфата из нервных волокон.  
*Р. У. Штрауб, Дж. Ферреро, П. Джироуек, М. Руиллер, А. Саламин (R. W. Straub, J. Ferrero, P. Jirounek, M. Rouiller, A. Salamin)* 95
- Влияние катехоламинов на ионную проницаемость клеточных мембран.  
*Д. Х. Дженкинсон, Д. Дж. Хейлетт, К. Коллер (D. H. Jenkinson, D. G. Haylett, K. Koller)* 102
- Основания для разграничения двух типов пуриnergических рецепторов.  
*Жоффрей Бернсток (Geoffrey Burnstock)* 120

## РЕЦЕПТОРЫ ГОРМОНОВ

Передача сигнала от рецепторов гормонов к аденилатциклазе—обзор данных и гипотезы.

*Эрнст Дж. М. Хелмрейх, Томас Пфейффер (Ernst J. M. Helmreich, Thomas Pfeuffer)*

133

Рецепторы эстрогенов и восприимчивость к действию гормонов: новые подходы в фармакологии и терапии.

*Этьен-Эмиль Больен (Etienne-Emile Baulien)*

142

Рецепторы эстрогенов в матке: взаимодействие с гепарином и очистка цитозольного рецептора.

*Джованни Альфредо Пука, Анна Мария Молилари, Никола Медичи, Бруно Моншармон (Giovanni Alfredo Pusa, Anna Maria Molinari, Nicola Medici, Bruno Moncharmont)*

166

Локализация связывающих центров гонадотропина в клетках-мишенях яичников с помощью световой микроскопии.

*Петер Петруц, Мадхабананда Сар, Уолтер Е. Штумпф (Peter Petrusz, Madhabananda Sar, Walter E. Stumpf)*

181

Места связывания и метаболизм гонадотропных гормонов в яичнике млекопитающих.

*Дж. Х. Абель, Т. Т. Чен, Д. В. Эндрес, М. К. Мак-Клеллан, М. А. Дейкман, Х. Р. Соейр, Дж. Д. Нисвендер, М. Х. Дж. Шмитц, М. П. Пинеда (J. H. Abel, T. T. Chen, D. V. Endres, M. C. McClellan, M. A. Diekman, H. R. Sawyer, G. D. Niswender, M. H. J. Schmitz, M. P. Pineda)*

198

## РЕЦЕПТОРЫ ЛЕКАРСТВ И ТОКСИНОВ В МЕСТАХ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

Связывание 1-фтор-2,4-дипитробензола и некоторых стильбен 2,2' ди сульфокислот с центрами, регулирующими анионную проницаемость на белке полосы 3 мембран эритроцитов.

*Х. Пассов (H. Passow)*

220

Изучение структурной активности некоторых лекарств, действующих как обратимые ингибиторы проницаемости мембран эритроцитов для хлорида: влияние заместителей в кольце.

*Р. Моте, Дж. Л. Кузен (R. Motais, J. L. Cousin)*

236

Натриевый канал как рецептор лекарств.

*Дж. М. Ришье (J. M. Ritchie)*

243

## РЕЦЕПТОРЫ ЛЕКАРСТВ И ТРАНСПОРТ

Опосредованный носителем транспорт и «текучесть» мембранных липидов.

*В. Вилбрандт (W. Wilbrandt)*

262

Вращательная диффузия мембранных белков.

*Р. Дж. Черри, У. Мюллер, Дж. Шнейдер (R. J. Cherry, U. Müller, G. Schnelder)*

268

Изучение мембран Halobacterium halobium методом замораживания-скальвания.

*В. Л. Боровягин, В. Г. Плакунова*

278

- Сопряженный литий-натриевый обмен в эритроцитах быка.  
*Йорген Фундер, Йенс Отто Вейч (Jørgen Funder, Jens Otto Wieth)* 288
- Изучение  $\text{Na}^+$ -зависимого антипорта  $\text{Li}^+$  и стимулированного бикарбонатом транспорта  $\text{Li}^+$  в эритроцитах человека.  
*Йохен Дум, Бернхард Ф. Беккер (Jochen Duhm, Bernhard F. Becker)* 296
- Действие фуросемида на нечувствительный к уабанину ток  $\text{K}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в клетках Эриха.  
*Петер Гек, Эрих Хейнц, Кристиан Петржик, Барбара Пфейффер (Peter Geck, Erich Heinz, Christian Pietrzyk, Barbara Pfeiffer)* 316
- Реконструкция электрогенных свойств сопряженного с градиентом натрия переносчика глюкозы в щеточной каемке почечной мембраны.  
*Н. Малати, Х. Прейзер, П. Фэрклох, Р. К. Крейн (P. Malathi, H. Preiser, P. Fairclough, R. K. Crane)* 323
- Стехиометрия реконструированного натриевого насоса.  
*Беатрис М. Анне (Beatrice M. Anner)* 332
- Неиспользование амилорида в качестве пробы при изучении транспорта и метаболизма натрия в мочевом пузыре жабы.  
*Митци Канесса, Педро Лабарка, Александр Лиф (Mitzy Canessa, Pedro Labarca, Alexander Leaf)* 339
- Действие амилорида на функции периферического нефрона.  
*Дж. Гейбисш (G. Giebisch)* 349
- Поглощение и распад уабанина, связанного с клетками HeLa.  
*Джон С. Кук, Эмили Т. Брайк (John S. Cook, Emily T. Brake)* 355

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Теория рецепторов в течение последних лет приобретает все большее значение в фармакологии, уже проведены многочисленные и важные работы по выделению и очистке рецепторов клеточных мембран для нейротрансмиттеров, лекарств и гормонов. В этой книге представлен междисциплинарный подход к проблеме рецепторов клеточных мембран. Описаны результаты изучения морфологии и химического состава клеточной мембраны, приведены данные о морфологии, биохимии и механизме действия рецепторов.

В книге обсуждается большое число методов, использованных в названных исследованиях, включая методы иммунологической идентификации рецепторов, световой микроскопии и ультраструктурного анализа, измерений кинетики связывания лекарств по регистрации мембранного шума, измерения трансмембранных потенциалов и токов, регистрации потоков трансмембранных маркеров, а также методы классической физиологии. Приведены биохимические методы очистки и характеристики рецепторов, а также методы изучения процессов связывания лекарств и гормонов. Детально описан механизм действия рецепторов, главным образом применительно к ионным потокам и ионному транспорту. И в этом случае рассмотрены различные подходы, в том числе использование специфических ингибиторов, изменение состава естественных мембран, оптические методы изучения подвижности мембранных белков, а также реконструкция транспортных систем в искусственной среде.

Можно надеяться, что эта книга будет способствовать сотрудничеству специалистов многих областей, включая фармакологов, биохимиков, физиологов и молекулярных биологов, занимающихся изучением рецепторов клеточных мембран.

*РАЛЬФ У. ШТРАУБ*  
*Женева, Швейцария*



# СТРУКТУРА МЕМБРАН И ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

## НЕКОТОРЫЕ СООБРАЖЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИИ СТЕРИНОВОЙ МОЛЕКУЛЫ

КОНРАД БЛОХ  
(KONRAD BLOCH)

*Отдел химии, Гарвардский университет, Кембридж,  
Массачусетс 02138, США*

Настоящая статья посвящена обсуждению некоторых уникальных структурных особенностей стериновой молекулы и доказательству того, что холестерин и близкие ему стеринные грибов и растений достигли функционального совершенства под действием отбора. Тот факт, что в мембранах эукариотов стериновые молекулы наряду с фосфолипидами представляют собой инвариантный компонент, наводит на мысль, что стериновая молекула обладает именно таким строением, которое может обеспечить комплементарное взаимодействие двух названных типов соединений в клеточной мембране. Мы можем понять структуру холестерина только в таком контексте, а не при рассмотрении изолированной молекулы.

А. И. Опарин и Haldane первыми занялись проблемой происхождения биологических молекул. Согласно гипотезам этих авторов, основные структурные типы соединений, составляющие клетки, образовались еще до возникновения жизни. Как предполагают, процесс пребиотической эволюции происходил в атмосфере, не содержащей кислорода, что предохраняло органические молекулы от разрушения. В последние годы были предложены некоторые химически приемлемые схемы пребиотического синтеза сахаров, аминокислот и предшественников нуклеиновой кислоты, причем некоторые из этих синтезов были проведены экспериментально в анаэробных условиях, являющихся моделью «первозданных» земных условий. Более того, само существование истинно анаэробных клеток позволяет принять гипотезу о возникновении жизни в бескислородной среде, где богатый пребиотический бульон служил в качестве источника органических молекул, необходимых для поддержания преимущественно гетеротропного образа жизни последующих поколений клеток. Однако если предположить, что анаэробная атмосфера существовала в ранних стадиях жизни Земли, нам придется строго ограничить возможности химического синтеза. Именно эти ограничения заставляют прийти к выводу, что холестерин или его предшественники не могут быть получены в результате химической эволюции, по крайней мере пока мы не предложим путей, не имеющих химического или биохимического происхождения. Стерины исключительно редко встречаются в про-

карнотах и практически полностью отсутствуют в анаэробных бактериях. Из этого мы делаем вывод, что появление аэробных клеток было предварительным условием для создания стериновой структуры [2, 4].

Существует достаточно много химических прецедентов, которые дают возможность представить, как абиотически могут быть получены изопреновые группы, полимеры или даже сквален. Однако не существует химически вероятного пути превращения ациклического сквалена в гидроксилсодержащую стериновую циклическую систему. Современный путь окислительной циклизации приводит к образованию ланостерина или 4,4',14-триметилхолестандиена [3]. По-видимому, сам по себе ланостерин не выполняет никакой метаболической функции; он не накапливается в качестве конечного продукта ни в одной из клеток. Скорее всего ланостерин представляет собой промежуточное соединение, которое быстро теряет три лишние метильные группы с образованием холестериновой структуры. Это деметилирование представляет собой окислительный процесс, требующий кислорода в качестве акцептора электронов [18]. Итак, по крайней мере до тех пор, пока кто-нибудь не предложит альтернативного пути превращения, от которого не осталось следов, вывод о том, что постскваленовые стадии биосинтеза холестерина возникли во время аэробной фазы биологической эволюции, представляется несомненным.

Следующая и основная задача — выяснить, почему превращение стерина идет дальше превращения ланостерина в биохимическом отношении. Стереохимически холестерин и его триметильное производное — ланостерин — идентичны. Если эволюция привела к удалению этих трех «лишних» метильных групп, это означает, что именно деметилированная структура оказалась функционально более соответствующей важнейшим свойствам клеток.

Важность холестерина и неспособность ланостерина заменить его в биологических системах наблюдали неоднократно: далее приводятся три примера, подтверждающие этот факт. Так, в анаэробных дрожжах ланостерин, искусственный ауксотроф стерина, хотя и поддерживает их рост, но очень слабо по сравнению с холестерином или эргостерином [14]. Далее, ланостерин, а также 4,4'-диметилхолестерин полностью неэффективны в поддержании развития насекомых в стадии личинки, которой необходимо получать с пищей экзогенные стерины, и не могут заменить в этом холестерин [8]. И, наконец, Vagelos и соавт. недавно описали стеринотребляющий мутант клеток яичника китайского хомячка, в котором цепь превращения стерина заблокирована в стадии ланостерина [7]. Такие клетки нормально растут на холестерине, но в отсутствие поступления стерина извне происходит внутриклеточное накопление ланостерина, приводящее к гибели и лизису клеток. Таким образом, ясно, что триметилхолестановые производные не могут заменить холестерин в поддержании нормальных внутриклеточных функций в перечисленных эукариотических системах.

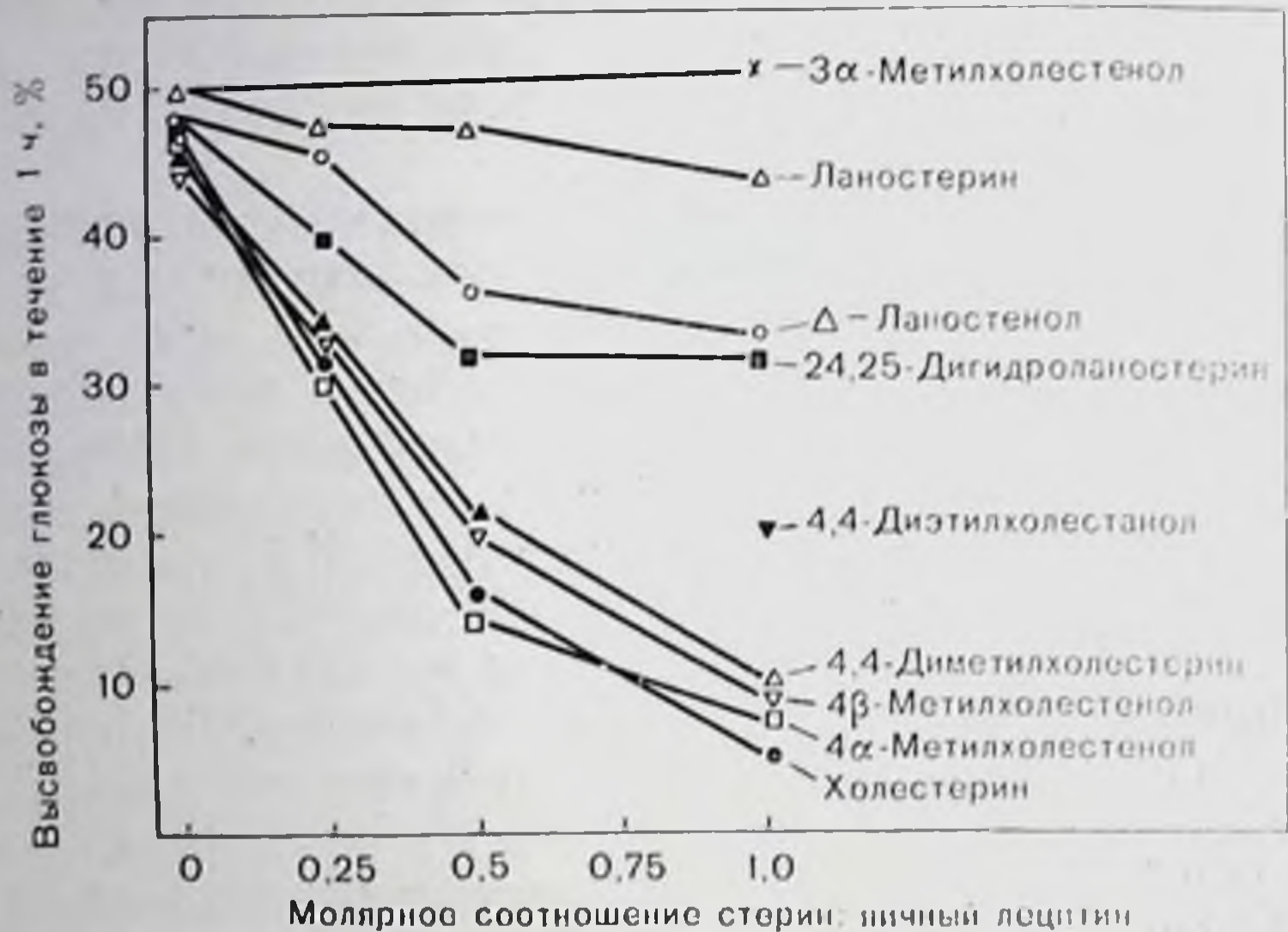


Рис. 1. Липосомы, содержащие стерины, получены из яичного лецитина и 5% мол. дицетилфосфата. Скорость выхода включенной глюкозы определяли по методу, описанному в статье Demel и соавт. [9]. После диализа аликвоты препаратов липосом анализировали ферментативным методом до и после инкубации в течение 1 ч при 40 °С.

Эксперименты с везикулами, полученными при воздействии ультразвука на фосфатидилхолин, прояснили некоторые структурные особенности, необходимые для продуктивного взаимодействия между стеринами и фосфолипидами в мембранах [9]. При изучении проницаемости везикул для включенных внутрь растворимых соединений установлено, что введение в состав мембран этих везикул холестерина резко уменьшает скорость выхода наружу включенной в везикулы глюкозы одновременно с понижением «текучести» мембран. Только стерины, содержащие в молекуле свободную экваториальную  $\beta$ -оксигруппу и имеющие циклическую стереохимию холестановой системы и алифатическую боковую цепь, способны менять свойства мембран подобно холестерину, также замедляя транспорт глюкозы [9]. Недавно мы провели подобные эксперименты с лецитиновыми везикулами, содержащими ланостерин или его некоторые алкилированные производные, в нормальных условиях являющиеся побочными продуктами превращения холестерина (Lin, Lala, Bloch, неопубликованные результаты) (рис. 1). В этих моделях эффект ланостерина минимален: в его присутствии выход глюкозы из везикул происходит почти с такой же скоростью, как и в случае, если мембраны вообще не содержат стерина. Однако 4,4'-диметилхолестерин, 4 $\alpha$ -метилхолестерин и 4 $\beta$ -метилхолестерин приводят почти к такому же замедлению выхода глюкозы, как и сам холестерин. В эту серию экспериментов были также включены два синтетических стерина, не встречающихся в природе: 3 $\alpha$ -метилхолестерин и 4,4'-диэтилхо-

лестанол. Первое из этих соединений не оказывает влияния на выход глюкозы, тогда как второе незначительно понижает его скорость.

Недавно для изучения поведения стерinov в мембранах [20] был использован метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), и вновь результаты, полученные для холестерина и ланостерина, резко различаются. В лецитиновых везикулах, содержащих холестерин и фосфолипид в соотношении 2 : 1, резонанс  $^{13}\text{C}$  зарегистрировать не удастся, поскольку молекула стерина в результате взаимодействия с фосфолипидом сильно связана. В противоположность этому при замене холестерина на ланостерин в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР можно выделить несколько резонансных полос, не принадлежащих фосфолипиду. Эти полосы были приписаны кольцевым атомам углерода  $\text{C}_{14}$  и  $\text{C}_{11}$ ,  $\text{C}_{21}$  или  $\text{C}_{19}$  и  $\text{C}_{18}$  или  $\text{C}_{20}$  ланостерина. При мембранах, содержащих 4,4'-диметилхолестерин, спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР не слишком отличается от спектра холестеринсодержащих мембран. В целом результаты, полученные методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии и при изучении транспорта глюкозы через мембраны, взаимодополняют друг друга и показывают, что ланостерин намного более подвижен в модельных фосфолипидных мембранах, чем его частично (4,4'-диметил-) или полностью деметилированные метаболиты. Таким образом, можно сделать вывод, что 14 $\alpha$ - $\text{CH}_3$ -группа ланостерина препятствует продуктивному встраиванию этого стерина в мембраны.

Согласно современным взглядам на организацию стерinov в мембране в некоторых ее участках наблюдается определенная комплементарность между холестерином и фосфолипидами, способствующая формированию стехиометрических комплексов между этими лигандами [6, 16]. Холестерин может прочно встраиваться между длинными ацильными цепями фосфолипида благодаря конформационно заторможенной, а потому малоподвижной тетраядерной циклической системе. Более того,  $\alpha$ -сторона или нижняя сторона холестана плоские, поскольку пять осевых атомов водорода (у  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_7$ ,  $\text{C}_9$  и  $\text{C}_{14}$ ) лежат в одной плоскости. Если предположить [6, 12, 20], что ОН-группы стерина участвуют в образовании основных водородных связей с одним из кислородов карбонового эфира на полярном конце фосфолипида, то очевидно, что плоская  $\alpha$ -сторона стерина будет расположена удобно для формирования ван-дер-ваальсовых сил притяжения с  $\text{C}_2$ — $\text{C}_8$ - или  $\text{C}_9$ -сегментом жирно-ацильной цепи, полностью находящейся в транс-конформации. В результате связывающий эффект стерина на менее конформационно заторможенные жирно-ацильные цепи будет наиболее отчетливо проявляться в участке бислоя вблизи поверхности воды и распространяться в глубь бислоя приблизительно до половины одного из монослоев.

Между «хвостовыми» частями двух липидных компонентов мембраны должно существовать лишь слабое взаимодействие. Свободное вращение разветвленной (изооктильной) боковой цепи стерина предоставит больше конформационной свободы парафиновым

углеродам этого участка (с 9-го по 16-й или 18-й), чем две непосредственно взаимодействующие или смежные жирно-ацильные цепи. Холестерин, таким образом, будет оказывать на бислой противоположное местное действие, отверждая одни участки бислоя и разжижая другие: «Стерин создает промежуточное по жидкости состояние» [16].

Названные эксперименты подчеркивают как важность молекулы холестерина для биологических и искусственных мембран, так и неспособность лапостерина играть аналогичную роль в мембранах. В свете рассмотренной модели мембраны мы можем предложить объяснение тому факту, что модификация лапостерина приводит к его функциональному усовершенствованию. Пространственные модели показывают, что 14  $\alpha$ -СН<sub>3</sub>-группа лапостерина (у С<sub>30</sub>) выдается из плоской стороны  $\alpha$ -стерина. Поскольку этот выступающий заместитель довольно громоздок, он вызывает резкое ослабление взаимодействий между  $\alpha$ -стериновой поверхностью и прилегающим сегментом жирно-ацильной цепи. Заслуживает внимания тот факт, что в современном пути биосинтеза стеринов прежде всего должна быть устранена мешающая 14-метильная группа [10]. (Сообщалось о существовании в малых количествах 14-метилхолестерола [13] и о накоплении в некоторых мутантах дрожжей 14  $\alpha$ -метилфестостерина [19]. Влияние этих соединений на мембраны еще необходимо исследовать.)

Как уже упоминалось, влияние 4,4-диметил- и 4-монометилпроизводных холестерина на искусственные мембраны не слишком отличается от действия самого холестерина (см. рис. 1). В соответствии с этими наблюдениями названные заместители стерического не препятствуют упаковке, что подтверждается и их пространственными моделями. Однако синтетический 4,4-диэтилхолестерин замедляет выход глюкозы из липосом в значительно меньшей степени, чем холестерин, что указывает на ключевое значение для взаимодействий в мембране прилегающего к С<sub>4</sub> участка  $\alpha$ -стороны холестерина. По-видимому, искусственные мембраны слишком малочувствительны, чтобы отреагировать на возмущающие стерические эффекты заместителей у С<sub>4</sub>, менее объемных, чем этильные группы. Могут быть и иные объяснения тому факту, что большинство мембранных стеринов больше не содержит метильных заместителей на  $\alpha$ -стороне молекулы. Метильные группы, прилегающие к С<sub>3</sub> могут нарушать водородные связи между оксигруппами стерина и полярным концом фосфолипида. В свою очередь прочность и местоположение водородной связи могут определить, насколько глубоко будет проникать в бислой стериновая молекула. И, наконец, причины удаления метильных групп у С<sub>4</sub> в своей основе могут иметь не стерический, а химический характер. Так, например,  $\Delta^4$ -3-кето-системы, являющиеся общим структурным компонентом всех стероидных гормонов, не могут быть образованы без удаления хотя бы одной СН<sub>3</sub>-группы у С<sub>4</sub>. Однако все эти объяснения представляются не очень убедительными, поскольку полностью деметилированные стерины обнаружены в мембранах кле-

ток не только животных (продуцирующих стероидные гормоны), но также растений и грибов.

Ферментативное удаление метильных групп из ланостериновой циклической системы отличается высокой селективностью и имеет место только для заместителей на  $\alpha$ -стороне молекулы. Так, за одним интересным исключением, стерины, не содержащие метилов у  $C_{18}$  или  $C_{19}$ , в природе не встречаются. (19-Норстерины обнаружены в некоторых губках. Предполагают [15], что они образовались в результате деметилирования холестерина.) Кажущееся отсутствие какого бы то ни было стремления отбора привести к дезактивированию  $\beta$ -стороны стерина опять-таки может быть объяснено специфической упаковкой стеринов и жирно-ацильных цепей. Метильные группы у  $C_{18}$  и  $C_{19}$  в рамках соответствующей молекулярной модели не представляют, по-видимому, помех для взаимодействия с жирно-ацильными цепями, даже если они целиком имеют трансконформацию. Можно полагать поэтому, что удаления метильных групп с  $\beta$ -стороны молекулы стерина не происходит, поскольку оно не привело бы к улучшению ван-дер-ваальсового связывания между стеринами и фосфолипидами. Действительно, недавно Huang [11] выдвинул гипотезу, что оставшиеся угловые метильные группы могут облегчать взаимодействие с цисолефиновыми ацильными цепями. В предпочтительной полной трансконформации олеиновая и пальмитиновая кислоты могут иметь изогнутую или петельчатую структуру, которая неблагоприятна для взаимодействия с другими ацильными цепями (насыщенными) или со стеринном. Однако, если единичная транс-гош трансформация произойдет у одного из атомов C, сопряженных двойной связью, с вращением вокруг  $-C=C-CH-$  одинарной связи (например, у  $C_{11}$ ), то олеиновая цепь может иметь две линейные части  $C_1-C_8$  и  $C_{11}-C_{18}$ , связанные одинарным транс-гош узлом. На пространственных моделях видно, что две угловые метильные группы  $\beta$ -стороны молекулы стерина помещаются в свободный объем гидрофобного кармана, образованного единичной транс-гош складкой. Таким образом, ван-дер-ваальсовы взаимодействия могут достичь максимума, если  $\beta$ -сторона стерина, снабженная выступающими угловыми метильными группами, будет индуцировать образование специфической конформации олеиновой цепи. Наличие модели, предусматривающей предпочтительную упаковку ненасыщенных ацильных цепей с  $\beta$ -стороной стерина, позволяет сделать еще одно предположение. В фосфолипидах положение  $C_2$  занято преимущественно олефиновыми кислотами и если они упаковываются совместно с  $\beta$ -стороной стерина, то стериновая OH-группа может образовать водородную связь только с  $C_1$  глицеридного карбонила, принадлежащего насыщенной ацильной цепи; оксигруппы стерина находятся слишком далеко, чтобы образовать водородную связь с эфирным карбонилем в положении  $C_2$  фосфоглицерида. Данные  $^{13}C$ -ЯМР-спектроскопии, согласующиеся с описанной более детальной структурной моделью, получены Yeagle и Martin с лецитин-холестериновыми везикулами [20].

На основании гипотезы и данных эксперимента выкристаллизовывается модель мембраны, в которой не только сохранены метильные группы на  $\beta$ -стороне стерина, но и до сих пор необъясненное нестатическое распределение насыщенных и ненасыщенных ацильных цепей по двум свободным центрам этерификации клеточных фосфолипидов.

## СТЕРИНЫ И ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

Следы стерина обнаружены в ряде прокариотов, но *Methylococcus capsulatus* представляет собой единственную бактерию, содержащую хорошо охарактеризованные стерин в достаточном количестве [1]. Основные стерин этого организма, облигатного метанотрофа, представляют 4,4-диметилхолестерин и 4-метилхолестерин, т. е. частично деметилированные производные ланостерина [1, 5].  $C_{27}$ -стерин присутствуют в малых количествах или вообще не обнаруживаются. Подобной картины в эукариотических клетках не обнаружено. Пока еще неизвестно, являются ли частично деметилированные метаболиты ланостерина необходимыми компонентами мембран *Methylococcus*. Этот микроорганизм устойчив к действию полиеновых антибиотиков нистатина и стипитановой кислоты (Dawson и Bloch, неопубликованные результаты), представляющих собой противогрибковые агенты, которые, как полагают, разрушают мембраны эукариотов за счет образования комплексов со стеринами. Но этот факт сам по себе не является доказательством того, что частично деметилированные метаболиты ланостерина являются в *Methylococcus* нефункциональными веществами. Может быть, противогрибковые антибиотики просто не могут проникнуть сквозь клеточную стенку бактерий.

Для роста некоторых штаммов *Mycoplasma*, являющихся исключением среди других прокариотов, необходимы стерин [17]. Холестерин сам по себе этому требованию удовлетворяет; он может быть также замещен теми же производными, которые оказывают холестериноподобное действие на проницаемость глюкозы через модельные лецитиновые мембраны [17]. В последних экспериментах мы более детально изучили потребность *Mycoplasma carnicolum* в стеринах и неожиданно обнаружили, что этот штамм одинаково хорошо растет как на холестерине, так и на ланостерине (Odrizola, Waitzkin и Bloch, неопубликованные результаты). Более того, мы показали, что ланостерин, добавленный к культуральной среде, может быть выделен из созревших клеток в первоначальном виде. Таким образом, для микоплазмы ланостерин сам по себе активен как фактор роста и, по-видимому, может выполнять мембранные функции холестерина.

Присутствие частично деметилированных производных ланостерина в *Methylococcus* и способность штаммов *Mycoplasma* расти на ланостерине находятся в противоречии с выдвинутой ранее в этой статье гипотезой о структуре и функции стерина. Для

прокариотических клеток, которые или синтезируют или потребляют стерин, удаление метильных групп с  $\alpha$ -стороны стерина не так необходимо, как для эукариотических клеток. Для согласования ранее полученных результатов с данными по бактериальным системам мы постулируем наличие еще одной добавочной функции стеринов в мембранах. Мы допускаем, что любой стерин способен пассивно проникать в мембрану, пока он достаточно липофилен. После такого проникновения стерин, внедрившийся между молекулами фосфолипида, прежде всего будет раздвигать смежные жирно-ацильные цепи и, таким образом, изменять ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Далее, помимо разделения цепей, стеринны будут давать дополнительный эффект за счет нарушения полярных взаимодействий, например между заряженными триметиламмонием и фосфатными группами смежных фосфолипидов. Если процесс встраивания в мембраны относительно независим от структуры стерина, ланостерин все еще представляется способным изменять мембранные свойства, даже если он недостаточно эффективно упаковывается с жирно-ацильными цепями. Предполагая, что такое разделение полярных концов фосфолипидных молекул может быть более примитивной функцией стеринов, мы можем принять и тот факт, что ланостерин может служить в качестве источника стерина для *Mycoplasma*. Остается выяснить, представляют ли синтез и утилизация стеринов относительно редкое явление среди прокариотов или встречается чаще, чем принято считать в настоящее время.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bird C. W., Lynch J. M., Pirt F. J., Reid W. W., Brooks C. J. W., Middle-ditch B. S. Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* grown on methane. *Nature*, 1971, 230, 473—474.
2. Bloch K. Oxygen and biosynthetic patterns. — *Fed. Proc.*, 1962, 21, 1058—1063.
3. Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. — *Science*, 1965, 150, 19—28.
4. Bloch K. On the evolution of a biosynthetic pathway. — In: *Reflections on Biochemistry*, ed. by A. Kornberg et al., 1976, pp. 143—150. Pergamon Press, Elmsford, N. Y.
5. Bouvier P., Rohmer M., Benevise P., Ourisson G.  $\Delta^8,14$  Steroids in the bacterium *Methylococcus capsulatus*. — *Biochem. J.*, 1976, 159, 267—271.
6. Brockerhoff H. Models of interaction of polar lipids, cholesterol and proteins in biological membranes. — *Lipids*, 1974, 645—650.
7. Chang T. V., Telakowski C., Vandenheuvel A. W., Alberts A. W., Vagelos P. R. Isolation and partial characterization of a cholesterol-requiring mutant of Chinese hamster ovary cells. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 832—836.
8. Clark H. J., Bloch K. The absence of sterol synthesis in insects. — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 2578—2582.
9. Demel R. A., Bruckdorfer K. R., van Deenen L. L. M. The effect of sterol structure on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and  $Rb^+$ . — *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, 255, 321—330.
10. Gautschi F., Bloch K. On the structure of an intermediate in the biological demethylation of lanosterol. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 684—689.
11. Huang C. H. Roles of carbonyl oxygen at the bilayer interface in phospholipid-sterol interaction. *Nature* 242—243.



12. *Huang C. H.* A structural model of cholesterol-phosphatidylcholine complexes in bilayer membranes.—*Lipids*, 1977, 12, 348—356.
13. *Knight J. C., Wilkinson E. J., Djerassi C.* The structure of the cactus sterol Mac-Dougallin. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 790—1798.
14. *Masters R.* Sterol metabolism in anaerobic yeast. Ph. D. thesis, Harvard University, 1963.
15. *Minale L., Sodano G.* Marine sterols, 19-nor-Stanols from the sponge *Axinella polypoides*.—*J. Chem. Soc.*, 1974, Perkin I, 1888—1892.
16. *Rothman J. E., Engleman D.* Molecular mechanism for the interaction of phospholipids with cholesterol.—*Nature*, 1972, 237, 42—44.
17. *Smith P. F.* Relation of sterol structure to utilization in pleuropneumonia-like organisms. — *J. Lipids Rev.*, 1964, 5, 121—125.
18. *Tchen T. T., Bloch K.* On the mechanism of enzymatic cyclization of squalene.—*J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 931—939.
19. *Trocha P. F., Jasne S. J., Sprinson D. B.* Novel sterols in ergosterol-deficient yeast mutants.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 59, 666—671.
20. *Yeagle P. L., Martin R. B.* Hydrogen bonding of the ester carbonyls in phosphatidylcholine bilayers. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 775.

**ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА ЛИМФОЦИТОВ:  
СТРУКТУРА ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ  
И ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ**

ФРЭНК С. УОЛШ, БРАЙН Х. БАРБЕР, МИШЕЛЬ ДЖ. КРАМПТОН  
(FRANK S. WALSH, BRIAN H. BARBER, MICHAEL J. CRUMPTON)

*Национальный институт медицинских исследований, Милл Хилл,  
Лондон NW71AA, Великобритания*

Клеточная поверхность лимфоцита вовлечена в регуляцию ряда его функций, включая реакцию на действие антигенов и растворимых факторов, взаимодействие с другими клетками, рост и дифференциацию [8]. Несмотря на многочисленные попытки изучить молекулярные основы перечисленных явлений, механизмы узнавания и клеточной реакции все еще не получили точного описания. Одним из необходимых условий выяснения этих механизмов на молекулярном уровне является знание деталей состава и структурной организации плазматической мембраны лимфоцита. Так, например, важно выяснить, каким именно образом информация, возникающая как следствие связывания лиганда (антигена) с рецептором на поверхности лимфоцита, передается через липидный бислой внутрь клетки. В этом смысле наиболее подходящими кандидатами являются трансмембранные белки, поскольку они экспонированы как на наружной, так и на внутренней (цитоплазматической) сторонах мембраны и могут представлять собой прямой канал для передачи информации. Если верно высказанное ранее предположение [20, 28], что белки, расположенные на цитоплазматической поверхности мембраны, регулируют топографию наружной поверхности мембраны в ответ на связывание поливалентных лигандов, то ключевым моментом в понимании молекулярных основ функций лимфоцита будет являться знание структуры внутренней поверхности мембраны. Одним из подходов к решению двух указанных проблем может служить использование вывернутых наизнанку везикул, полученных из плазматической

мембраны лимфоцита. Настоящая статья посвящена выделению вывернутых мембранных везикул и их использованию для анализа внутренней поверхности мембраны и трансмембранных белков.

## ВЫВЕРНУТЫЕ МЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

Выделение вывернутых везикул плазматической мембраны лимфоцита базируется на двух предпосылках. Во-первых, предполагается, что в процессе разрушения клетки для отделения плазматических мембран некоторые мембранные везикулы выворачиваются самопроизвольно. Это предположение подтверждается данными Bennett и Cuatrecasas [3], которые наблюдали, что препараты плазматических мембран жировых клеток содержат как вывернутые, так и нормальные везикулы. Во-вторых, предполагается, что углеводные компоненты плазматической мембраны расположены исключительно на наружной стороне клетки [13, 19]. В этом случае углеводсвязывающие белки с широкой специфичностью, например, конканавалин А (Кон А) могут быть использованы для отделения нормальных везикул от вывернутых благодаря предпочтительному связыванию первых. Прямое доказательство высказанных предпосылок было получено морфологическим путем с использованием Кон А, ковалентно связанного с ферритином, в качестве лиганда. На рис. 2 ясно видно, что очищенный препарат лимфоцитарных плазматических мембран из лимфатических узлов свиной брыжейки содержит два типа везикул, один из которых сильно метится частицами ферритина, тогда как другой остается немеченым.

Фракционирование плазматических мембран лимфоцитов свиньи на колонке с Кон А-сефарозой, результаты которого приведены в табл. 1, показывает, что 30—50% мембранного белка

Т а б л и ц а 1. Фракционирование плазматических мембран эритроцитов свиньи \*

Лиганд	Незадерживаемая фракция (% от добавленного белка)
Кон А-сефароза 4В**	30—50
Сефароза 4В	90±10
АЛС-сефароза 4В***	50

\* Очищенную фракцию мембран (4 мг по белку) элюировали при 24 °С с заполненной соответствующим сорбентом колонки размером 5×1 см изотоническим раствором хлорида натрия забуференным трис-НСl с рН 7,4.

\*\* Pharmacia Fine Chemicals.

\*\*\* С сефарозой 4В была связана иммуноглобулиновая фракция кроличьей антисыворотки против лимфоцитов свиньи в количестве 20 мг белка на 1 мл набухшего геля.

постоянно (было сделано 12 экспериментов) проходит через колонку не задерживаясь. Если же вместо Кон А-сефарозы использовать просто сефарозу 4В, то, по данным 6 экспериментов, через колонку без задержки проходит 90±10% белка. Если мембран-



Рис. 2. Электронная микрофотография очищенного препарата лимфоцитарных мембран лимфатического узла брыжейки свиньи, окрашенного с помощью ковалентно связанного с ферритном конканавалина А. Видны сильно меченые и немеченые мембранные везикулы. Увеличение: длина масштабной линии 200 нм [24].

ную фракцию, без задержки прошедшую через колонку с Кон А-сефарозой, повторно нанести на такую же колонку, то в этом случае через Кон А-сефарозу без удерживания проходит уже более 80% мембранного белка. Аналогичные результаты были получены и при использовании антисыворотки против лимфоцитов свиньи (АЛС), которая была получена иммунизацией цельными лимфоцитами и поэтому содержала антитела преимущественно против поверхностных структур лимфоцитов [16]. В этом случае колонка из сефарозы, содержащей конъюгированную фракцию иммуноглобулинов АЛС, не удерживала 50% препарата плазматических мембран, т. е. такое же количество, как и колонка с Кон А-сефарозой. Более того, мембранная фракция, не удерживаемая колонкой с Кон А-сефарозой, проходила без задержки и через колонку с АЛС-сефарозой и наоборот. Как и было предсказано, не удерживаемая Кон А-сефарозой фракция не окрашивалась Кон А-ферритином и была таким образом идентифицирована как неметящиеся везикулы исходного препарата плазматических мембран (см. рис. 2). Фракционирование с помощью Кон А не зависит от природы препарата и от способа разрушения клеток. Так, препараты плазматических мембран из селезенки мышей, клеток зобной железы мышей или культуры лимфобластоидных клеток ВВ18 человека, которые были разрушены с помощью тканевого пресса в случае твердых тканей [22] или разрушением клеток в суспензии [7], дали во всех случаях одинаковые результаты.

Наблюдаемое фракционирование везикул из лимфоцитарных плазматических мембран может иметь несколько объяснений. Возможность того, что связывания Кон А-сефарозы или Кон А-ферритина с частью препарата не происходит из-за отсутствия на несвязываемой фракции мембран углеводов или их маскировки белками окружающей среды, следует исключить, поскольку специальные исследования показали идентичность углеводного и белкового состава задерживаемой мембранной фракции и исходного препарата мембран [24]. Факт аналогичного фракционирования мембранных препаратов на АЛС-сефарозе и Кон А-сефарозе также говорит против высказанного предположения, поскольку вряд ли АЛС идентифицируют только углеводные компоненты. Прямое подтверждение тому, что незадерживаемая мембранная фракция имеет обращенную ориентацию, было получено с использованием антисыворотки, приготовленной иммунизацией животных незадерживаемой на Кон А мембранной фракцией, которая предварительно была обработана глутаровым альдегидом с целью фиксации ее ориентации. Как показано на рис. 3, антисыворотка вызывает сильную агглютинацию незадерживаемой мембранной фракции, но не способна вызвать сколько-нибудь заметную агглютинацию цельных свиных лимфоцитов. В противоположность этому АЛС вызывает выраженную агглютинацию цельных клеток, но не незадерживаемой мембранной фракции. Эти результаты показывают, что по данным агглютинации поверхность цельных лимфоцитов и мембранных везикул незадерживаемой фракции имеют разный

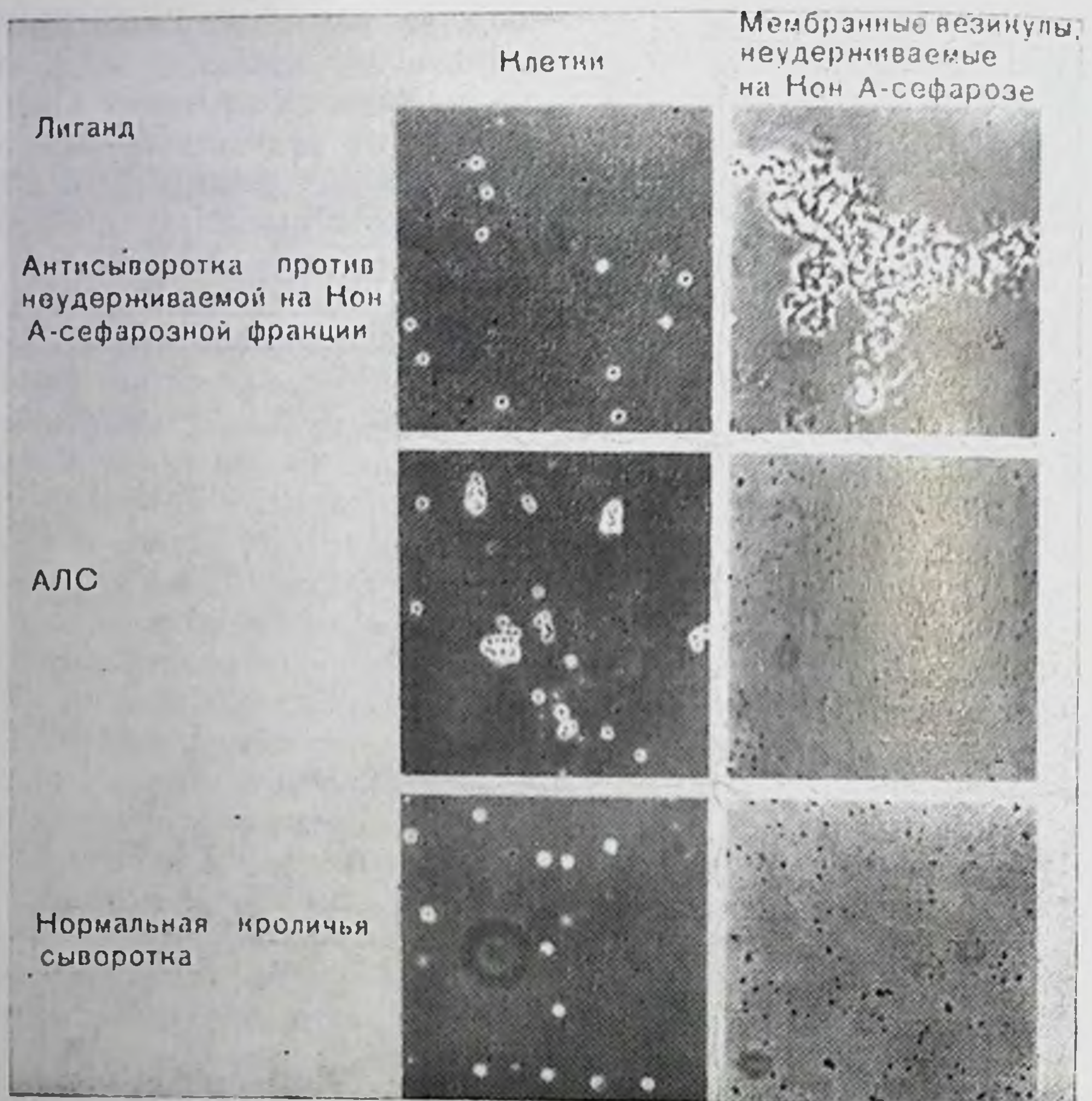


Рис. 3. Агглютинация лимфоцитов свиньи и мембранных везикул, неудерживаемых на Кои А-сефарозе, антисывороткой против неудерживаемой фракции и цельных лимфоцитов (АЛС). В качестве контроля использовали нормальную кроличью сыворотку (НКС). Агглютинацию мембранных везикул оценивали методом фазово-контрастной микроскопии [24].

набор антигенных детерминант. Хотя это различие полностью соответствует предложенной вывернутой ориентации незадерживаемых везикул, оно, разумеется, не является однозначным доказательством такой ориентации.

### СТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ

Если высказанные предположения относительно ориентации незадерживаемых мембранных везикул справедливы, то антисыворотка против незадерживаемой на Кои А мембранной фракции должна послужить удобным средством для изучения структуры цитоплазматической стороны мембраны лимфоцита. В качестве основного метода для такого изучения был выбран перекрестный иммуноэлектрофорез в присутствии детергента — окиси додецилдиметиламина [4]. На рис. 4, А показано, что антисыворотка про-

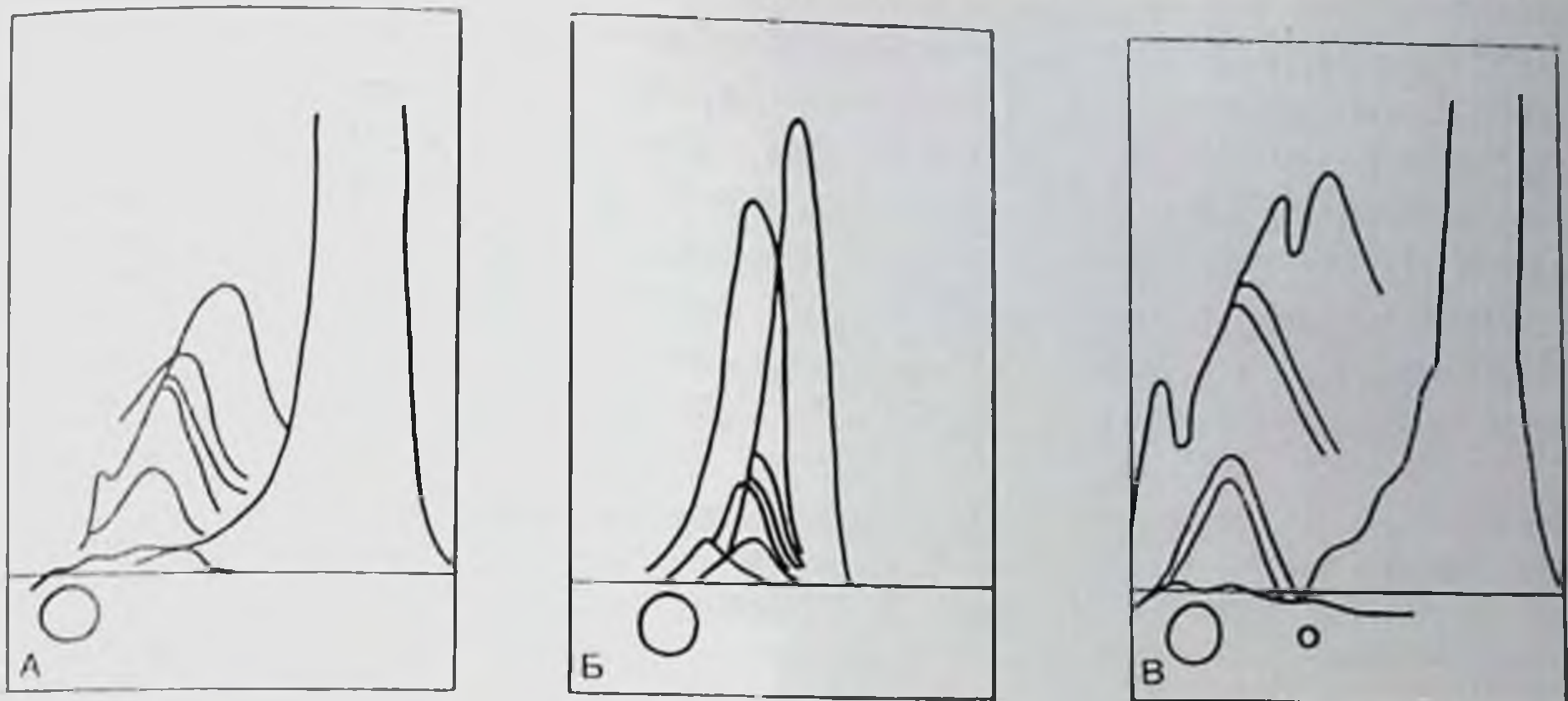


Рис. 4. Результаты перекрестного иммуноэлектрофореза.

А — плазматические мембраны лимфоцитов свиньи против антисыворотки неударживаемой на Кои А-сферазе фракции; Б — ЭДТА-экстракт плазматических мембран; В — сопряженный электрофорез [15] плазматических мембран лимфоцитов и актина скелетных мышц свиньи против той же антисыворотки [25].

тив неударживаемой на Кои А мембранной фракции дает семь дуг осаждения с очищенной фракцией плазматических мембран лимфоцитов свиньи. Семь антигенов, узнаваемых антисывороткой, соответствуют, по-видимому, периферическим пегликозилированным белкам, расположенным на внутренней поверхности мембраны. Это положение базируется на следующих доказательствах. Во-первых, антигены с большой степенью вероятности являются пегликозилированными белками, поскольку соответствующих линий осаждения не удастся обнаружить, если антисыворотка взаимодействует с гликопротеином плазматической мембраны лимфоцита, полученными адсорбцией на *Lens culinaris* лектин-сефарозе и последующим элюированием метил- $\alpha$ -D-маннопиравозидом [12]. Во-вторых, экстрагированная ЭДТА фракция плазматических мембран лимфоцита, полученных в условиях, обеспечивающих растворение периферических белков внутренней поверхности мембраны [17], при взаимодействии с антисывороткой дает такую же картину преципитации, как и цельные мембраны (рис. 4, Б).

Гель-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия показывает, что ЭДТА экстракт содержит белок с молекулярной массой 43 000 дальтон, представляющий собой один из основных белков очищенной плазматической мембраны. Показано, что этот белок имеет выраженную структурную гомологичность с актином [1]. В свете этих данных кажется вполне вероятным, что актин представляет собой один из периферических мембранных белковых антигенов, выявляемых антисывороткой против незадарживаемых на Кои А компонентов мембранной фракции. Это предположение вполне соответствует современным моделям структуры плазматической мембраны и расположения актина внутри лимфоцитов [9, 10]. Прямое подтверждение выдви-

ного предположения было получено с помощью совместного иммуноэлектрофореза, продемонстрировавшего идентичность между одной из линий преципитации плазматической мембраны и аутентичного образца G-актина из скелетной мышцы свиньи (рис. 4, В). Еще одно подтверждение наличия антител против актина в антисыворотке против незадерживаемой мембранной фракции было получено при иммунофлуоресцентном окрашивании срезов различных тканей. В табл. 2 сравнивается реакцион-

Т а б л и ц а 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание, даваемое на различных срезах ткани антисыворотками против незадерживаемой Кош А-сфаразой-4В мембранной фракции против актина

Ткань	Сыворотка	
	против незадерживаемой мембранной фракции	против актина*
Желудок крысы	—	+
Печень »	+	+
Почечные клубочки крысы	+	+

\* Использовали сыворотку человека, обладающую активностью антитела против гладкой мышцы [23].

носпособность антисыворотки против незадерживаемой мембранной фракции и типичного антитела против гладкой мышцы, т. е. антисыворотки против актина [23]. Хотя антисыворотка против незадерживаемой мембранной фракции и не дает заметного окрашивания с желудком крысы, окрашивание, даваемое ею на образцах печени и почечных клубочков крыс, неотличимо от окрашивания, даваемого антисывороткой против актина. Антисыворотка против незадерживаемой мембранной фракции отличается от антисыворотки против актина и при окрашивании зафиксированных ацетоном лимфоцитов. В этом случае сыворотка с антителами против гладкой мышцы окрашивает цитоплазматические микрофиламенты [10], тогда как в случае антисыворотки против незадерживаемой мембранной фракции основная доля флуоресценции оказывается ассоциированной с плазматической мембраной. Все еще остается неясным, насколько эти различия в реакционной способности отражают разницу в антигенности немышечного и мышечного актинов.

### ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Белки, пронизывающие липидный бислой плазматической мембраны лимфоцита, были идентифицированы при сравнении результатов, получаемых при ковалентном мечении наружной и внутренней поверхностей мембраны. Этот подход базируется на подробном изучении мембраны эритроцита [5] и предусматривает использование катализируемого лактопероксидазой йодирования

при направленном мечении [14]. При этом предполагается также, что в системе присутствуют вывернутые мембранные везикулы, непроницаемые для лактопероксидазы. Незадерживаемые на Кои А везикулы плазматической мембраны, описанные ранее, но разным данным, имеют обращенную ориентацию и были поэтому использованы в качестве таких вывернутых везикул. Однако их существенный недостаток заключается в том, что они проницаемы для молекул с относительно невысокой массой, например трипсина [24]. С помощью центрифугирования в градиенте плотности декстрана была, однако, отобрана субпопуляция везикул, непроницаемых для декстрана с молекулярной массой 10 000 дальтон и, следовательно, для лактопероксидазы, молекулярная масса которой составляет 78 000 дальтон. Катализируемое лактопероксидазой йодирование таких везикул дает картину, отличную от получаемой при мечении полипептидов, проведенном с интактными лимфоцитами, когда мечению подвергалась наружная поверхность мембраны. Так, например, на рис. 5 показаны результаты, полученные с

интактными культивированными человеческими клетками BR18 и с вывернутыми везикулами, приготовленными из плазматических мембран этих клеток. Сравнение полученных результатов показывает, что по меньшей мере восемь полипептидов метятся на обеих — внешней и внутренней — сторонах: они совместно мигрируют при электрофорезе в полиакриламидном геле.

Недостатком описанных исследований является невозможность идентифицировать определенный компонент поверхности с тем или иным йодированным полипептидом. Эта проблема была решена

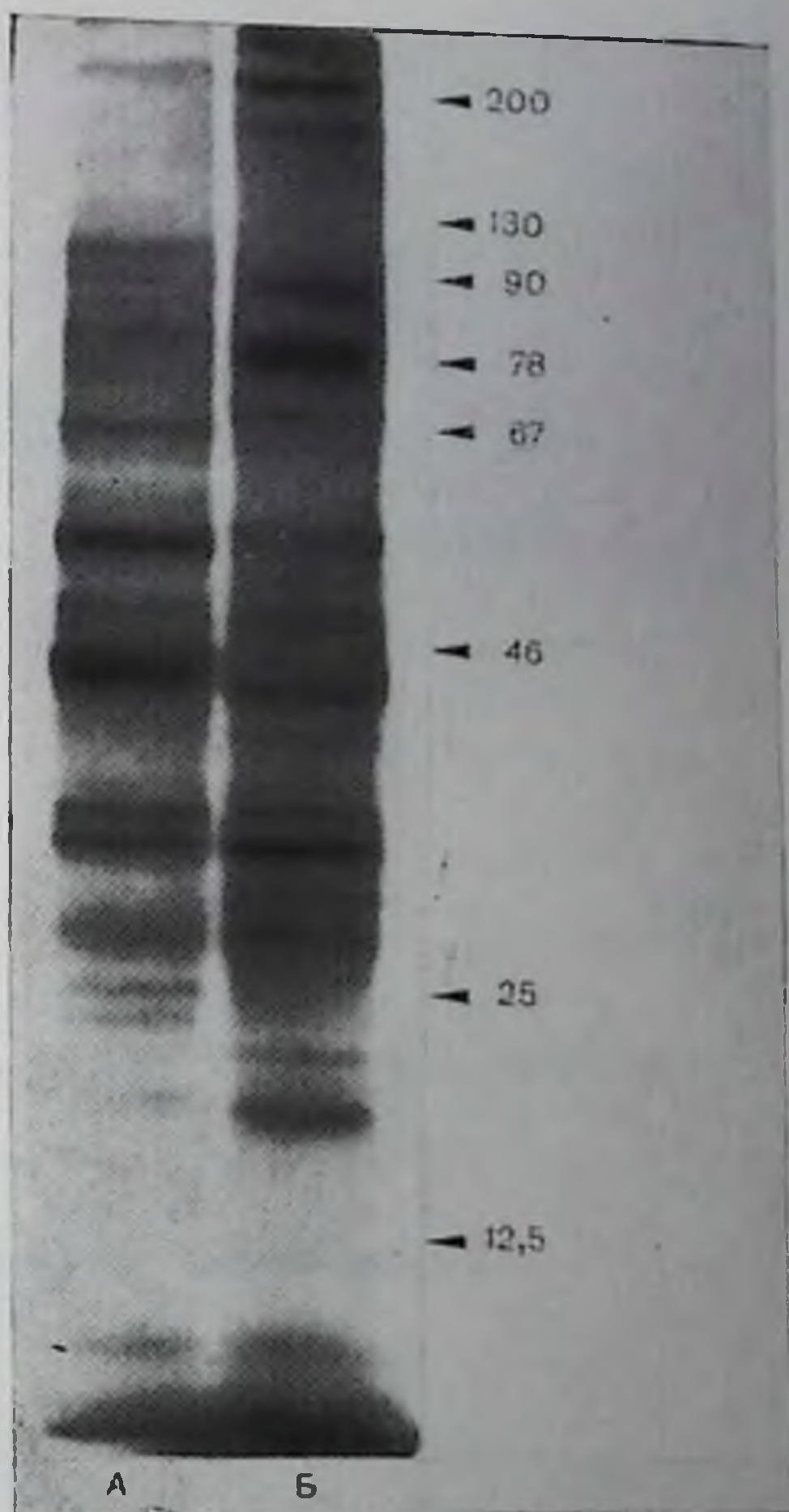


Рис. 5. Сравнение полипептидов, меченных методом лактопероксидазного йодирования, (А) цельных клеток BR18 и (Б) герметичных вывернутых везикул из мембран клеток BR18. Меченные  $^{125}\text{I}$  полипептиды разделяли гель-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и исследовали методами автордиографии. Молекулярные массы определяли с использованием стандартных белков [27].



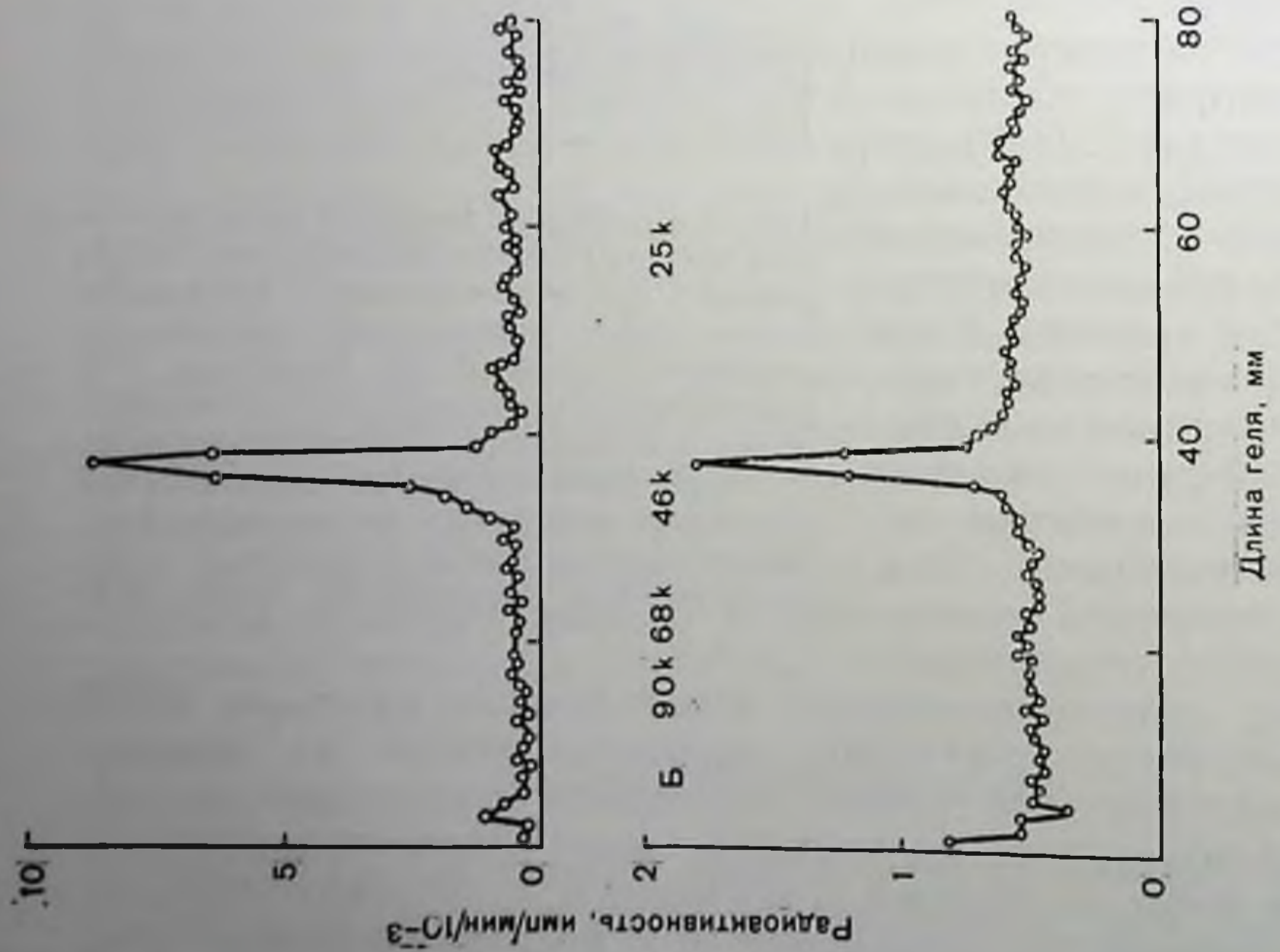
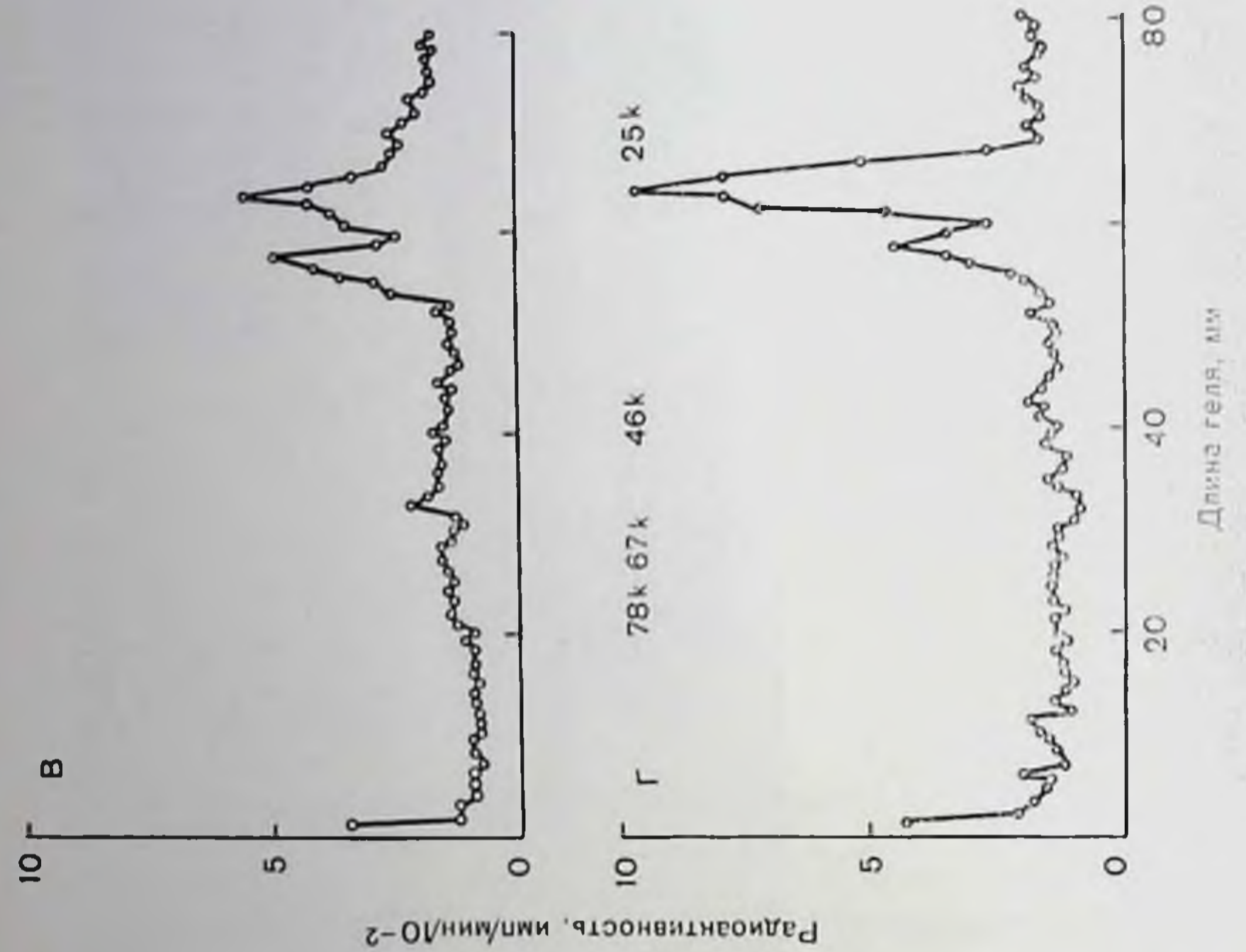


Рис. 6. Анализ иммунопреципитатов гель-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Меченые  $^{125}\text{I}$  герметичные вывернутые везикулы из плазматических мембран осаждали с помощью антисывороток против:  $\beta_2$ -микроглобулина человека (Б), HLA-Ia (Г), Ig человека (Е), Ig мыши (З) и Thy-1 (К). Представленные картины следует сравнивать с полученными для соответствующих неподправленных плазматических мембран, осажденных антисыворотками против:  $\beta_2$ -микроглобулина человека (А), HLA-Ia (В), Ig человека (Д), Ig мыши (Ж) и Thy-1 (И). Молекулярные массы определяли с использованием стандартных белков [27].

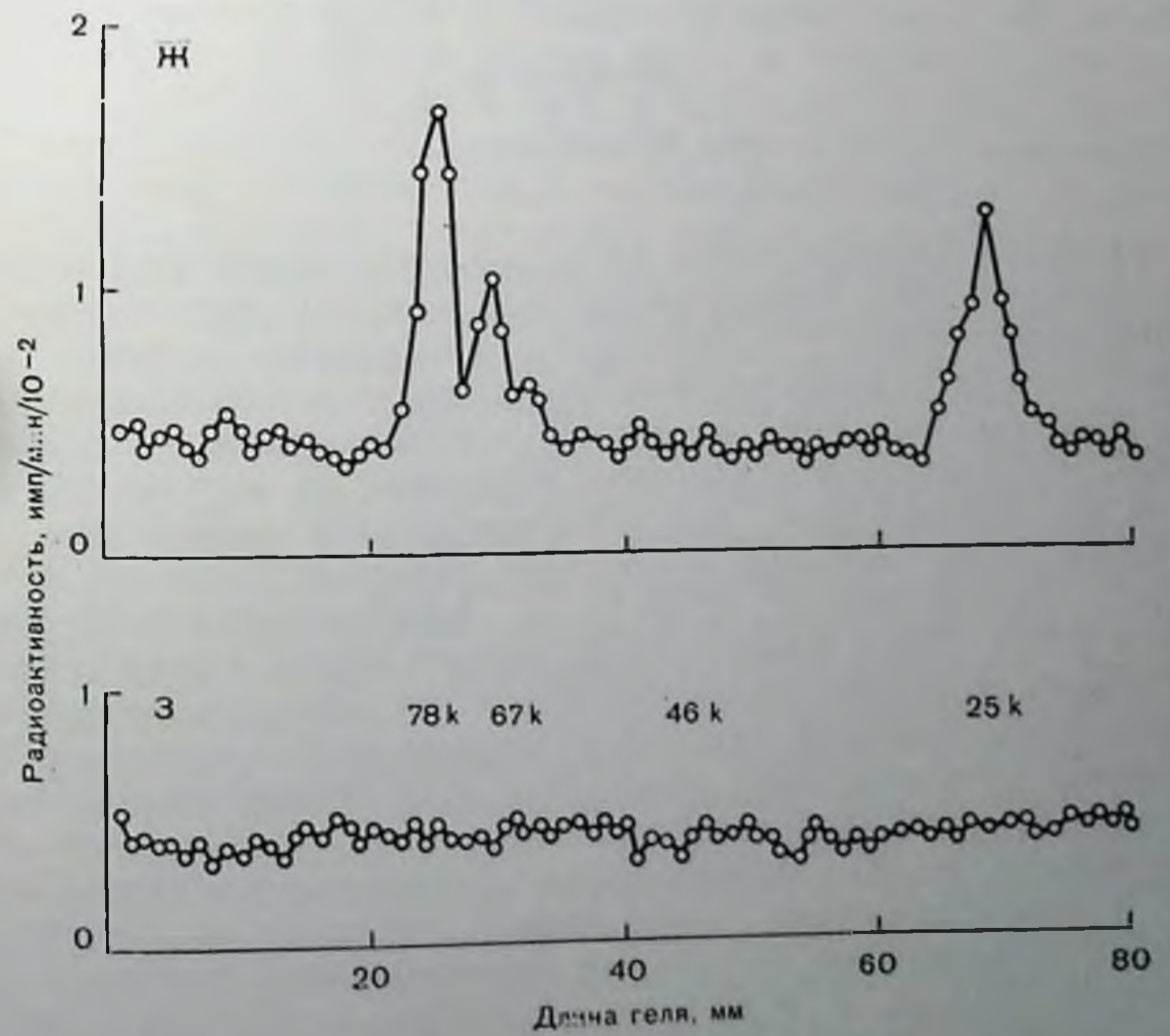
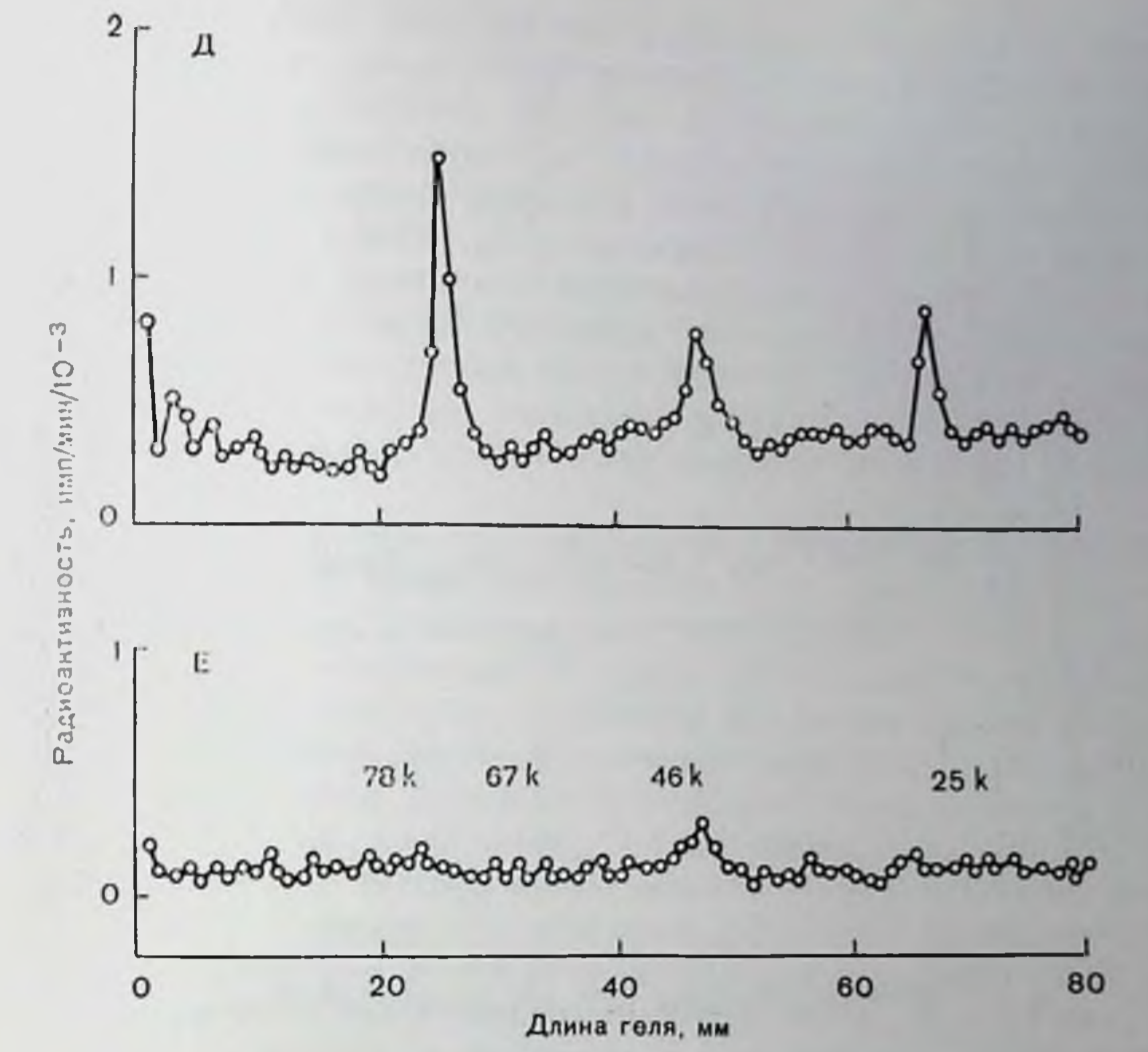


Рис. 6, продолжение.

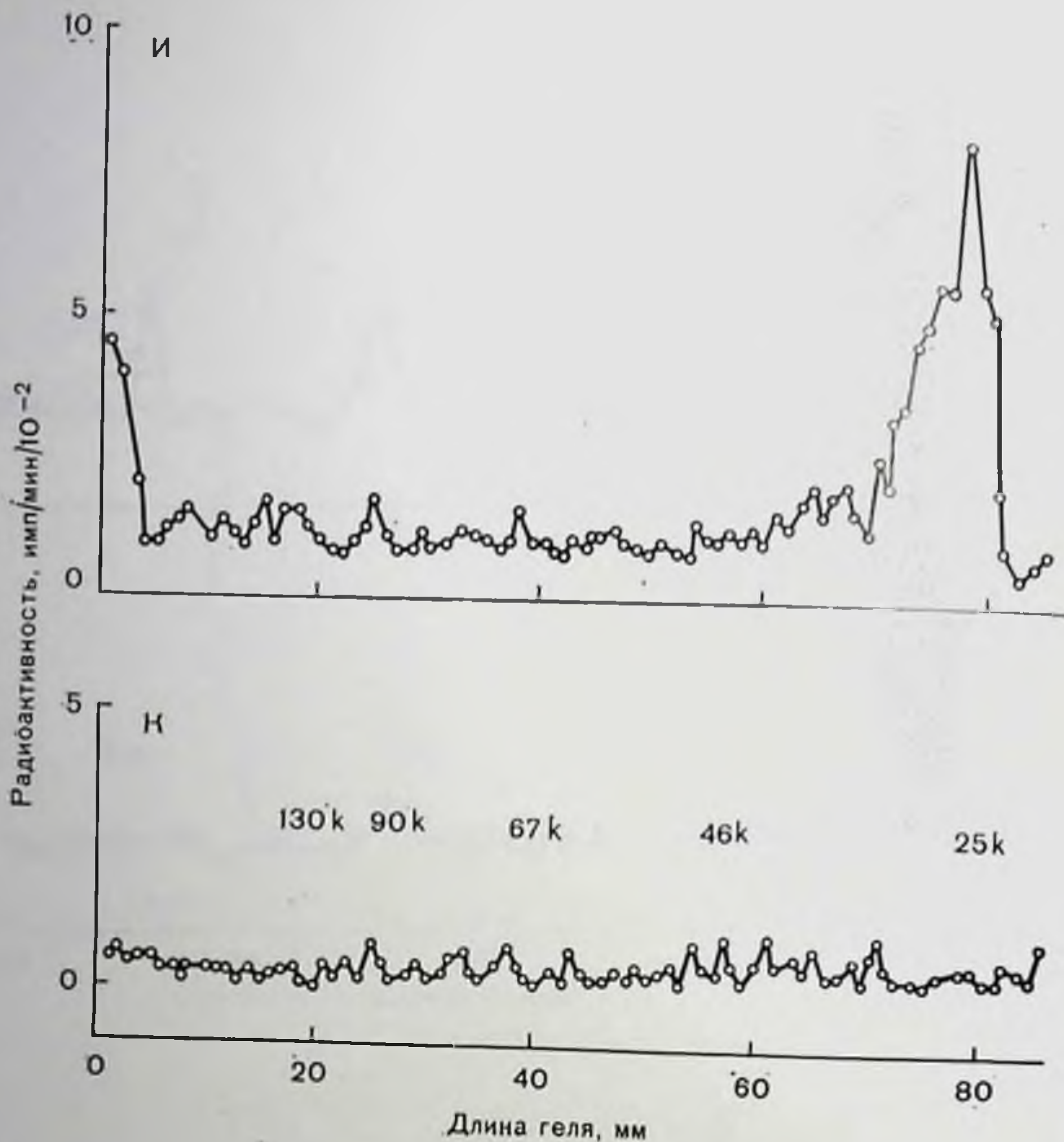


Рис. 6, продолжение.

на благодаря использованию антисывороток против индивидуальных поверхностных антигенов для осаждения соответствующего антигена из меченных  $^{125}\text{I}$  вывернутых мембранных везикул после полной солюбилизации компонентов везикул в деоксихолате натрия. При этих условиях осаждение меченого антигена является веским подтверждением его экспонирования на внутренней мембране и, следовательно, его трансмембранной ориентации. Для изучения были выбраны следующие поверхностные антигены: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-Ia и иммуноглобулин M (IgM) клеток BR18, Thy-1 клеток зубной железы мыши, а также IgM и IgD клеток мышинной селезенки. Было показано, что, по данным иммунофлюоресценции, каждый из перечисленных антигенов экспонирован на поверхности лимфоцита, а по данным иммунопреципитации солюбилизованных деоксихолатом компонентов мембран, предварительно подвергнутых ненаправленному йодированию с использованием хлорамина T, каждый из антигенов является компонентом очищенной плазматической мембраны [11]. Антигены HLA-A, B и C были осаждены с помощью козьей антисыворотки против  $\beta_2$ -микроглобулина из мочи человека. Такой

выбор был обусловлен тем, что эти антигены содержат полипептид с молекулярной массой 43 000 дальтон, который нековалентно связан с  $\beta_2$ -микроглобулином [7]. Для осаждения HLA-Ia антигенов была использована кроличья антисыворотка против HLA-Ia, полученная иммунизацией фракцией гликопротеинов плазматических мембран клеток BR18 [21]. Антиген Thy-1 из зубной железы мыши был осажден кроличьей антисывороткой против Thy-1 из крышного мозга. IgM из BR18-клеток был осажден под действием козьей антисыворотки против человеческого IgM, а IgM и IgD из плазматических мембран мышинной селезенки были осаждены под действием кроличьей антисыворотки против мышинных иммуноглобулинов.

Результаты различных экспериментов по иммунопреципитации суммированы на рис. 6. Иммунопреципитация антигенов HLA-A, B и C из меченных  $^{125}\text{I}$  вывернутых мембранных везикул дает только одну полосу молекулярной массы 43 000 дальтон (рис. 6, Б), чье положение соответствует положению линии контрольного преципитата из ненаправленно йодированной плазматической мембраны (рис. 6, А). Сходные результаты были получены и для HLA-Ia антигенов. Рис. 6, В показывает, что эти антигены состоят из двух полипептидов с молекулярной массой 33 000 и 28 000 дальтон, а из рис. 6, Г видно, что обе цепи помечены на внутренней поверхности мембраны. В противоположность перечисленным результатам ни  $\mu$ - и L-цепи человеческого Ig, ни  $\mu$ -,  $\delta$ - и L-цепи Ig из мышинной селезенки не метятся в вывернутых мембранных везикулах (рис. 6, Е и 6, З соответственно), хотя очищенные плазматические мембраны клеток BR18 и мышинной селезенки содержат IgM (рис. 6, Д) и IgM и IgD (рис. 6, Ж). Подобно этому было показано, что антиген Thy-1 является компонентом плазматических мембран зубной железы мыши (рис. 6, И), но не подвергается мечению в вывернутых везикулах (рис. 6, К).

Значимость полученных результатов в значительной степени зависит от того, насколько выбранная для исследований субпопуляция везикул из плазматических мембран является действительно вывернутой и непроницаемой для лактопероксидазы. Невозможность мечения некоторых известных антигенов клеточной поверхности (см. рис. 6) свидетельствует о непроницаемости везикул для лактопероксидазы и поддерживает предположение о вывернутом строении этих везикул. Подобно этому различные картины мечения интактных клеток и мембранных везикул (см. рис. 5) говорят в пользу существования различных поверхностных структур, что согласуется с данными по различной ориентации антигенов. Если приведенные выше рассуждения корректны, следует признать, что по меньшей мере восемь полипептидов, входящих в состав плазматической мембраны клеток BR18, включая полиморфные цепи антигенов HLA-A, B и C и обе цепи антигенов HLA-Ia, являются трансмембранными. Хотя отсутствие мечения антигена Thy-1 и мембраносвязанных Ig в вывернутых везикулах на первый взгляд и свидетельствует о том, что эти белки не про-

позывают мембрану, это умозаключение не является однозначным, поскольку высокоселективная процедура мечения приводит к йодированию только экспонированных остатков тирозина и гистидина. С другой стороны, определенные аргументы могут быть приведены и в пользу того, что отсутствие мечения IgM отражает его истинную ориентацию. Так, мембраносвязанный IgM связывает намного меньше детергента, чем типичные интегральные мембранные белки, в том числе антигены HLA-A, B и C, HLA-Ia и Thy-1 [2, 18, 21]. Это выраженное различие свидетельствует, что IgM погружен в липидный бислой в меньшей степени, чем трансмембранные белки, например антигены HLA-A, B, C и Ia, и согласуется с предположением, что IgM не пронизывает мембрану. С другой стороны, поскольку антиген Thy-1 связывает такие же количества детергента, как и антигены HLA-A, B, C и Ia [2, 21], можно полагать, что он также имеет трансмембранную ориентацию.

Значение этих результатов, относящихся к биологической функции антигенов, пока трудно оценить. Так, даже если IgM не имеет трансмембранной ориентации, то он может приобрести ее в результате связывания с рецептором, пронизывающим мембрану. Подобно этому, остается неопределенным, связана ли трансмембранная ориентация антигенов HLA-A, B, C и Ia с их функцией или этот факт имеет более простую причину, являясь, например, следствием общего свойства мембранных гликопротеинов [6], связанным со способом их биосинтеза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очищенные препараты плазматических мембран лимфоцитов гетерогенны в отношении связывания с Кон А- или АЛС-сефарозой. Имеется ряд свидетельств в пользу того, что несвязываемая (незадерживаемая) фракция мембранных везикул представляет собой обращенные, вывернутые везикулы. В частности, антисыворотка против незадерживаемой на Кон А фракции мембранных везикул специфична в основном по отношению к внутренней стороне плазматической мембраны. При использовании этой антисыворотки доказано, что поверхность цитоплазматической мембраны содержит по меньшей мере семь негликозилированных периферических белков, включая актин.

Субпопуляция вывернутых везикул, непроницаемых для декстрана с молекулярной массой 10 000 дальтон, была использована для идентификации трансмембранных белков. Это удалось сделать путем сравнения набора полипептидов, метящихся в результате катализируемого лактопероксидазой йодирования, в интактных лимфоцитах и во фракции вывернутых мембранных везикул. По результатам гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия установлено, что по меньшей мере восемь полипептидов пронизывают мембрану. Информация об ориентации определенных антигенов поверхности лимфоцита получена методом иммунопреципитации с использованием специ-

фических антисывороток. Было показано, что антигены человека HLA-A, B, C и Ia метятся при йодировании внутренней поверхности мембраны, тогда как мембраносвязанный IgM человека, а также мышинные IgM, IgD и антиген Thy-1 такому мечению не подвергаются. Был сделан вывод, что антигены HLA-A, B, C и Ia имеют трансмембранную ориентацию.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barber B. H., Crumpton M. J. Actin associated with purified lymphocyte plasma membrane.—FEBS Lett., 1976, 66, 215—220.
2. Barclay A. N., Letarte-Muirhead M., Williams A. F., Faulkes R. A. Chemical characterisation of the Thy-1 glycoproteins from the membranes of rat thymocytes and brain.—Nature, 1976, 263, 563—567.
3. Bennett V., Cuatrecasas P. Preparation of inverted plasma membrane vesicles from isolated adipocytes.—Biochim. Biophys. Acta, 1973, 311, 362—380.
4. Bjerrum O. J., Bog-Hansen T. C. Immunochemical gel precipitation technique in membrane studies.—In: Biochemical Analysis of Membranes, ed. by A. H. Maddy, 1976, pp. 378—426. Chapman and Hall, London.
5. Bretscher M. S. A major protein which spans the human erythrocyte membrane.—J. Mol. Biol., 1971, 59, 351—357.
6. Bretscher M. S., Raff M. C. Mammalian plasma membranes.—Nature, 1975, 258, 43—49.
7. Bridgen J., Snary D., Crumpton M. J., Barnstable C., Goodfellow P., Bodmer W. F. Isolation and N-terminal amino acid sequence of membrane-bound human HLA-A and HLA-B antigens.—Nature, 1976, 261, 200—205.
8. Crumpton M. J., Allan D., Auger J., Green N. M., Maino V. C. Recognition at cell surfaces: Phytohemagglutinin-lymphocyte interaction.—Philos. Trans. R. Soc. Lond. B., 1975, 272, 173—180.
9. Edelman G. M. Surface modulation in cell recognition and cell growth.—Science, 1976, 192, 218—226.
10. Fagraeus A., Lidman K., Biberfeld G. Reaction of human smooth muscle antibodies with human blood lymphocytes and lymphoid cell lines.—Nature, 1974, 252, 246—247.
11. Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S. The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity.—Biochem. J., 1963, 89, 114—123.
12. Hayman M. J., Crumpton M. J. Isolation of glycoproteins from pig lymphocyte plasma membrane using *Lens culinaris* phytohemagglutinin.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 47, 923—930.
13. Hirano H., Parkhouse B., Nicolson G. L., Lennox E. S., Singer S. J. Distribution of saccharide residues on membrane fragments from a myeloma-cell homogenate, Its implications for membrane biogenesis.—Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 2945—2949.
14. Hubbard A. L., Cohn Z. A. Specific labels for cell surfaces.—In: Biochemical Analysis of Membranes, ed. by A. H. Maddy, 1976, p. 427—501. Chapman and Hall, London.
15. Kröll J. Immunochemical identification of specific precipitin lines in quantitative immunoelectrophoresis patterns.—Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1969, 24, 55—60.
16. Levey R. H., Medawar P. B. Nature and mode of action of antilymphocytic serum. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 1130—1137.
17. Marchesi V. T., Steers E. Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane.—Science, 1966, 159, 203—204.
18. Melcher U., Uhr J. W. Density differences between membrane and secreted immunoglobulins of murine splenocytes.—Biochemistry, 1977, 145—152.
19. Nicolson G. L., Singer S. J. The distribution and asymmetry of mammalian cell surface saccharides utilizing ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains.—J. Cell. Biol., 1974, 60, 236—248.

20. Schreiner G. F., Fujiwara K., Pollard T. D., Unanue E. R. Redistribution of myosin accompanying capping of surface Ig.—*J. Exp. Med.*, 1977, 145, 1393—1399.
21. Snary D., Barnstable C. J., Bodmer W. F., Goodfellow P. N., Crumpton M. J. Cellular distribution, purification, and molecular nature of human Ia antigens.—*Scand. J. Immunol.*, 1977, 6, 439—452.
22. Snary D., Woods F. R., Crumpton M. J. Disruption of solid tissue for plasma membrane preparation.—*Anal. Biochem.*, 1976, 74, 457—465.
23. Trenchev P., Holborow E. J. The specificity of antiactin serum.—*Immunology*, 1976, 31, 509—518.
24. Walsh F. S., Barber B. H., Crumpton M. J. Preparation of inside out vesicles of pig lymphocyte plasma membrane.—*Biochemistry*, 1976, 15, 3557—3563.
25. Walsh F. S., Barber B. H., Crumpton M. J. Structure of the inner surface of lymphocyte plasma membrane.—*Biochem. Soc. Trans.*, 1977, 5, 306—309.
26. Walsh F. S., Barber B. H., Crumpton M. J. Orientation of glycoproteins in pig lymphocyte plasma membrane.—*Biochem. Soc. Trans.*, 1977, 5, 309—311.
27. Walsh F. S., Crumpton M. J. Orientation of cell-surface antigens in the lipid bilayer of lymphocyte plasma membrane.—*Nature*, 1977, 269, 307—311.
28. Yahara I., Edelman G. M. Electron microscope analysis of the modulation of lymphocyte receptor mobility.—*Exp. Cell. Res.*, 1975, 91, 125—142.

## ПОДХОД ИММУНОЛОГОВ К ИЗУЧЕНИЮ РЕЦЕПТОРОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

ДЖ. ДЖ. В. НОССАЛЬ  
(G. J. V. NOSSAL)

*Институт медицинских исследований им. Вальтера и Элизы Холл,  
Королевский госпиталь Мельбурна, Викториа 3050, Австралия*

Подобно тому как это произошло с биологами, работающими в самых разных областях, иммунологи в последние годы также начали проявлять все больший интерес к клеточным мембранам. Хотя этот интерес выражается в самых разнообразных формах, основные эксперименты, выполненные иммунологами с клеточными мембранами, могут быть включены в один из пунктов следующей классификации:

1. Природа и свойства рецепторов В- и Т-лимфоцитов, позволяющих названным клеткам взаимодействовать с антигенами.
2. Природа и свойства антигенов клеточных мембран, ответственных за взаимодействие клеток внутри иммунной системы, например за взаимодействие между Т- и В-лимфоцитами.
3. Свойства клеточной поверхности, лежащие в основе активации лимфоцитов.
4. Природа, свойства и функции различных определенных антигенов, являющихся поверхностными антигенами лимфоцитов и, по-видимому, характерных для лимфоцитов разной степени зрелости или выполняющих различные функции.
5. Лимфоцит как модель для изучения мембранных явлений и общих явлений клеточной биологии.

Поскольку две другие статьи этого раздела связаны в основном с п. 5, остается сделать несколько замечаний по каждому из других пунктов.

## РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ АНТИГЕНОВ НА В-ЛИМФОЦИТАХ

Около 20 лет назад Burnet [3] предложил новую теорию образования антител, которую мы именуем сейчас теорией клонального отбора (рис. 7). Эта теория постулирует, что генетическая информация, необходимая для продуцирования животным любого антитела, которое оно в принципе может продуцировать, изначально находится в животном еще до попадания в его тело соответствующего антигена. В этом смысле иммунный ответ рассматривался как селективный в противоположность предшествующим теориям, согласно которым поступающий антиген диктовал синтез соответствующего нового белка. В соответствии со взглядами Burnet лимфоциты в организме различаются, приобретая в результате процесса соматической мутации различные рецепторы на поверхности, которые фактически представляют собой молекулы «природного» антитела. В результате каждый отдельный лимфоцит рассматривается как обладающий способностью продуцировать один, и только один, тип антитела, а именно тот, который соответствует рецептору, находящемуся на поверхности данного лимфоцита.

В настоящее время мы знаем, что в действительности лимфоциты могут быть разделены на две большие группы, а именно на В-лимфоциты, или лимфоциты, продуцируемые костным мозгом и предназначенные для продуцирования антител, и Т-лимфоциты, или лимфоциты, продуцируемые вилочковой железой, которые не выделяют антител, а обеспечивают различные формы опосредованных клетками иммунных явлений, таких, как отсроченная гиперчувствительность или отторжение пересаженных органов. Т-лимфоциты являются также важными регуляторами иммунного ответа, обладая способностью повышать или подавлять интенсивность образования антител В-лимфоцитами. При этом оказывается, что теория Burnet в основном приемлема, по крайней мере для В-лимфоцитов.

Первый результат, согласующийся с клональным отбором, появился

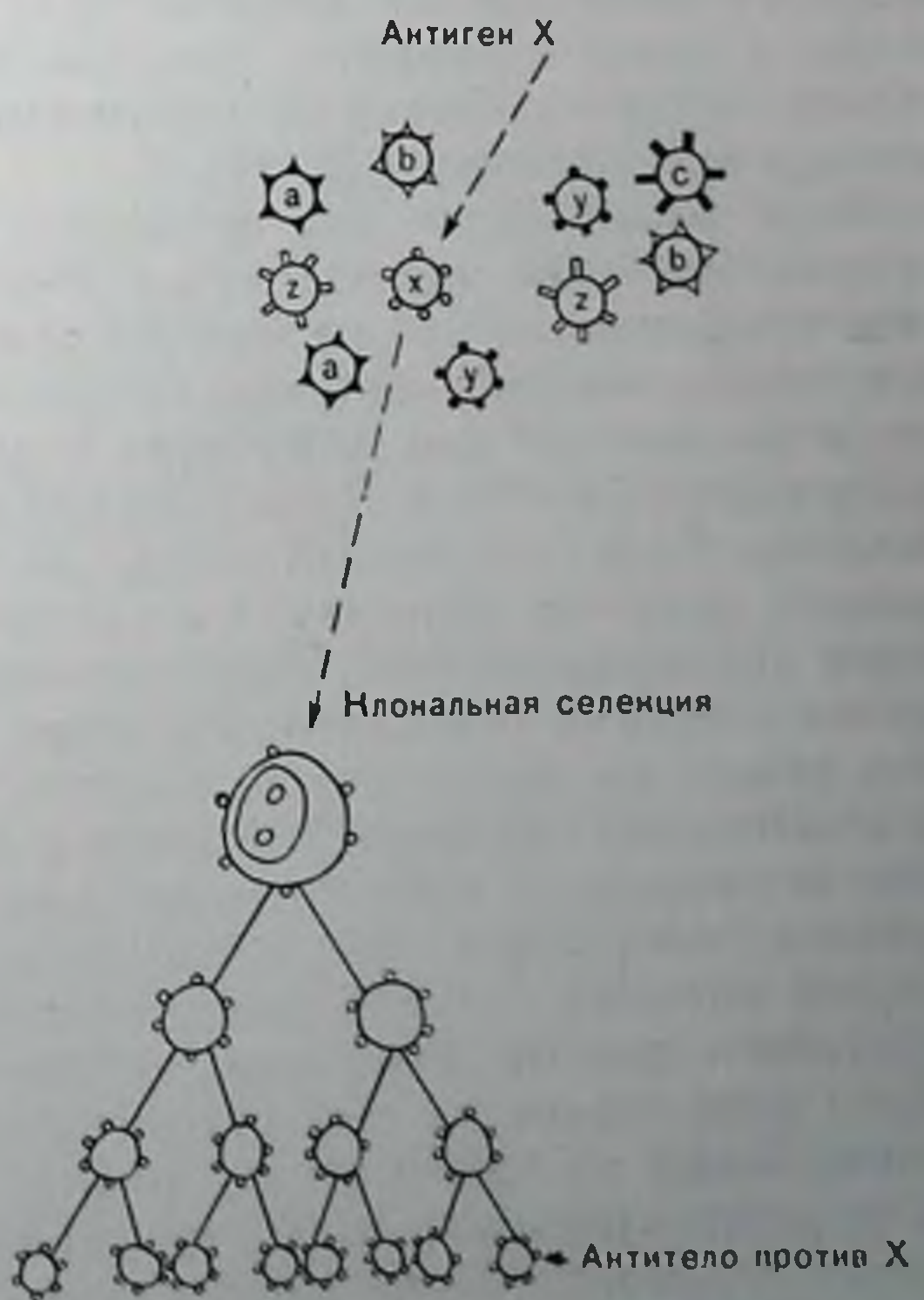


Рис. 7. Теория приобретения иммунитета методом клонального отбора.

после экспериментов, в процессе которых животные были многократно подвергнуты действию различных опытных антигенов, таких, как бактериальные штаммы А, В и С, после чего была изучена способность индивидуальных лимфоидных клеток образовывать антитела, для чего использовали чувствительный микрокапельный анализ [8]. Оказалось, что одна лимфоидная клетка способна образовывать или анти-А-, или анти-В-, или анти-С-антитела, но не два и не три из них одновременно. Такое правило: «одна клетка, одно антитело» по крайней мере не противоречит точке зрения клонального отбора. В последующие годы были получены новые важные свидетельства в пользу этой точки зрения. Было, в частности, показано [12], что В-лимфоциты действительно несут рецепторы иммуноглобулинов на своей поверхности, и мы теперь знаем, что большинство антигенно нестимулированных В-клеток имеет на своей поверхности два химических класса иммуноглобулинов: IgM и IgD [4]. Было продемонстрировано и то, что определенный белковый антиген, предварительно радиоактивно помеченный, связывается с поверхностью только малого количества лимфоцитов из всей популяции — порядка 1 на 5000 [7]. Более того, если такие лимфоциты удаляются из популяции клеток, например, методом аффинной хроматографии на связанном антигене или функционально подавляются благодаря связыванию антигена, меченного тяжелыми изотопами (так называемое самоубийство лимфоцитов горячим антигеном), то популяция в целом сохраняет способность продуцировать антитела против любого антигена за исключением того, который использовался в эксперименте [2, 16].

Хотя большинство перечисленных доказательств весьма впечатляет, наиболее прямым путем доказательства справедливости идеи клонального отбора был бы ответ на вопрос, как на самом деле повела бы себя индивидуальная клетка, выбранная на основании наличия на ней рецепторов к данному антигену, при культивировании *in vitro* в среде с определенной концентрацией этого антигена. Будет ли она действительно реагировать на присутствие данного антигена образованием соответствующих антител, не замечая других антигенов? Подобная попытка обогатить популяцию клеток клетками определенного клопа, т. е. способными реагировать только на определенный антиген, наталкивается на ряд чисто технических трудностей. Однако в последнее время мы научились использовать набор относительно простых методов для получения популяций клеток из селезенок иммунизированных мышей, настолько обогащенных клетками, способными к взаимодействию с данным антигеном, что после функционирования примерно одна клетка из трех относится к *in vitro* образующему антитела клону по сравнению с одной клеткой из 10 000 или 20 000 до фракционирования. Это соотношение, на наш взгляд, настолько близко к пределу клонального отбора, насколько мы вообще можем к нему подойти, особенно если иметь в виду сравнительно невысокую жизнеспособность лимфоцитов в культуре, что делает



почти невозможным достижение 100% эффективности клонирования [11].

Стало также ясным, что антигенсвязывающая способность одинакова для обоих классов клеток, содержащих на своей поверхности IgM и IgD [4]. Это объясняется тем, что оба класса иммуноглобулинов имеют одинаковые легкие цепи и одинаковый вариабельный участок в тяжелой цепи: иными словами, в одной клетке тот же самый ген V транслоцируется к гену, ответственному за синтез обеих тяжелых цепей —  $\mu$  и  $\delta$ .

Есть еще немало поводов для дискуссий на тему о том, как именно разные В-клетки стали обладателями различных «естественных» антител, позволяющих этим клеткам избирательно реагировать на антигены. Некоторые исследователи полагают, что среди лимфоидных клеток и их предшественников действует особый соматический генетический процесс, или мутации, или рекомбинация, или некие другие процессы, благодаря которым относительно небольшое число зародышевых генов для V-участков антител может тем не менее генерировать достаточно большой набор распознающих участков в целом организме. Другие исследователи склоняются к мнению, что в зародышевой линии закодированы многочисленные гены для V-участков тяжелых и легких цепей и что правило «одна клетка, одно антитело» является всего лишь примером запрограммированной дифференциации, т. е. просто избирательной активации одной пары V-генов внутри каждой клетки.

Существование на поверхности клетки двух классов антител также вызывает недоумение. Одна возможность [15] заключается в том, что клетки, несущие только IgM, легко «выключаются» антигеном и их раннее появление в онтогенезе должно было привести к исключению клонов, реакционноспособных по отношению к собственным антигенам, из системы распознавания. Последующее появление на поверхности обоих IgM и IgD может означать возникновение клеток, готовых включиться в образование антител при соответствующей встрече с антигеном.

### ПРИРОДА РЕЦЕПТОРОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН Т-ЛИМФОЦИТОВ

В то время как иммуноглобулиновая природа рецепторов антигенов в В-клетках является общепринятой, по поводу химической природы рецепторов антигенов Т-клеток существует много противоречивых мнений. Соответствующие антиглобулиновые антисыворотки неспособны окрашивать поверхность Т-лимфоцитов или же делают это очень слабо. Однако ряд экспериментов позволяет полагать, что рецепторы Т-клеток содержат вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина, присоединенный к невариабельной части, которая отличается от любой из известных цепей иммуноглобулинов, но может иметь некоторые общие свойства с  $\mu$ -цепью. По поводу существования легких цепей в составе

рецепторов Т-клеток существуют разногласия. Некоторые данные указывают, что они входят в состав рецепторов, но не связаны ковалентно с тяжелыми цепями [5]; другие исследователи вообще не смогли обнаружить их присутствия. Однако если мы согласимся принять наличие в рецепторах Т-лимфоцитов V-участков тяжелых цепей, то для нас будет ясно, что принципиальный механизм генерирования набора распознающих участков должен быть достаточно близок для Т- и В-клеток.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ В ЛИМФОИДНОЙ СИСТЕМЕ

Большая часть иммунных ответов предусматривает взаимодействие между различными типами клеток до начала образования антител или развития опосредованного клетками иммунного ответа [6]. Три типа взаимодействующих клеток включают антигенно-глощающие клетки или макрофаги, различные типы Т-клеток и разные подвиды В-клеток. Вслед за поглощением антигена макрофагами происходит стимуляция Т-лимфоцитов, по-видимому, в результате распознавания этого антигена в ассоциате с мембранным белком, являющимся продуктом одного из генов комплекса гистосовместимости [13]. Пока неясно, является ли набор распознающих участков Т-клеток каким-то образом приспособленным для узнавания антигенных детерминант соответствующего соединения, а именно физического ассоциата между антигеном гистосовместимости и посторонним соединением, или же необходимо всестороннее распознавание постороннего антигена соответствующим рецептором Т-клетки и антигена гистосовместимости макрофага антигеном гистосовместимости Т-клетки или его рецептором. Существенным является пока тот факт, что, по-видимому, Т-клетка узнает антиген в ассоциате с белком комплекса гистосовместимости.

Активированные Т-клетки не только участвуют в явлении опосредованного клетками иммунного ответа, но и взаимодействуют с В-клетками. Существуют две различающиеся по неопределенным пока признакам популяции Т-клеток. Одна из них, называемая клетками-помощниками, предназначена увеличивать образование антител В-клетками, а другая, называемая клетками-подавителями, обладает способностью понижать образование антител, или ингибируя Т-клетки-помощники или непосредственно действуя на В-клетки. Некоторые из перечисленных внутрилимфоидных регуляторных феноменов опосредованы, по-видимому, некоторыми растворимыми факторами, многие из которых также содержат белки, кодируемые генами комплекса гистосовместимости. Природа этих факторов и детали механизмы межклеточных взаимодействий в смысле как структуры соответствующих факторов, так и природы лимфоцитарных рецепторов этих факторов представляют собой сегодня одну из наиболее интенсивно развивающихся областей иммунологии [14].

## АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Еще одна важная область интересов для иммунологов, занимающихся клеточными мембранами, это активация лимфоцитов [9]. Возникновение клеток иммунной системы, будь то клетки, продуцирующие антитела, или клетки, опосредующие различные реакции Т-лимфоцитов, включало также развитие способности неактивных лимфоцитов претерпевать деление и образование клонов специализированных в отношении различных эффекторов клеток. Очевидно, что названные процессы представляют собой мембранные явления, к которым наряду с другими относится и взаимодействие антигена с поверхностью клетки. Вероятно, в большинстве случаев для инициации активации необходимы совместно действующие митогены. Из-за наличия клонального отбора изучение молекулярной биологии активации лимфоцитов с помощью аутентичных антигенов затруднительно, поскольку они способны взаимодействовать лишь с малой субпопуляцией имеющих в наличии лимфоцитов. Поэтому особое внимание уделяется использованию модельных митогенов, вызывающих активацию всей или по крайней мере большей части изучаемой популяции лимфоцитов. В качестве таких моделей широко используются растительные лектины; некоторые из них избирательно стимулируют Т-лимфоциты, а другие — В-лимфоциты. Несмотря на значительное число работ в этой области, единодушие в вопросе фундаментальных механизмов активации все еще не достигнуто. Некоторые исследователи полагают, что важным условием активации является агрегация небольшого количества рецепторов клеточной мембраны, кластеризация которых приводит к образованию кальциевого канала. И действительно, некоторые кальцевые ионофоры могут имитировать процессы активации лимфоцитов; кроме того, известно, что многие агенты, способные вызывать активацию лимфоцитов, представляют собой многовалентные лиганды, провоцирующие агрегацию рецепторов на поверхности клетки. Другие ученые по-прежнему полагают, что фундаментальным механизмом активации может быть аллостерическое изменение мембранного рецептора. Более сложные теории предусматривают и одновременную агрегацию рецепторов.

## АНТИГЕНЫ ПОВЕРХНОСТИ ЛИМФОЦИТА

Тот факт, что иммунный ответ регулируется многими факторами, предусматривающими межклеточное взаимодействие, вызвал повышенный интерес к функциональным подвидам двух разных классов лимфоцитов: Т-клеток и В-клеток. Исследования в области разграничения функциональных подклассов концентрируются вокруг макромолекул клеточной мембраны, характерных для определенного подкласса, и базируются обычно на серологических методах. Некоторые из этих макромолекул (поверхностных маркеров) появляются в результате созревания лимфоцитов и их

рецепторов Т-клеток существуют разногласия. Некоторые данные указывают, что они входят в состав рецепторов, но не связаны ковалентно с тяжелыми цепями [5]; другие исследователи вообще не смогли обнаружить их присутствия. Однако если мы согласимся принять наличие в рецепторах Т-лимфоцитов V-участков тяжелых цепей, то для нас будет ясно, что принципиальный механизм генерирования набора распознающих участков должен быть достаточно близок для Т- и В-клеток.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ В ЛИМФОИДНОЙ СИСТЕМЕ

Большая часть иммунных ответов предусматривает взаимодействие между различными типами клеток до начала образования антител или развития опосредованного клетками иммунного ответа [6]. Три типа взаимодействующих клеток включают антигенно-глобализирующие клетки или макрофаги, различные типы Т-клеток и разные подвиды В-клеток. Вслед за поглощением антигена макрофагами происходит стимуляция Т-лимфоцитов, по-видимому, в результате распознавания этого антигена в ассоциате с мембранным белком, являющимся продуктом одного из генов комплекса гистосовместимости [13]. Пока неясно, является ли набор распознающих участков Т-клеток каким-то образом приспособленным для узнавания антигенных детерминант соответствующего соединения, а именно физического ассоциата между антигеном гистосовместимости и посторонним соединением, или же необходимо всестороннее распознавание постороннего антигена соответствующим рецептором Т-клетки и антигена гистосовместимости макрофага антигеном гистосовместимости Т-клетки или его рецептором. Существенным является пока тот факт, что, по-видимому, Т-клетка узнает антиген в ассоциате с белком комплекса гистосовместимости.

Активированные Т-клетки не только участвуют в явлении опосредованного клетками иммунного ответа, но и взаимодействуют с В-клетками. Существуют две различающиеся по неопределенным пока признакам популяции Т-клеток. Одна из них, называемая клетками-помощниками, предназначена увеличивать образование антител В-клетками, а другая, называемая клетками-подавителями, обладает способностью понижать образование антител, или ингибируя Т-клетки-помощники или непосредственно действуя на В-клетки. Некоторые из перечисленных внутрилимфоидных регуляторных феноменов опосредованы, по-видимому, некоторыми растворимыми факторами, многие из которых также содержат белки, кодируемые генами комплекса гистосовместимости. Природа этих факторов и детали механизмы межклеточных взаимодействий в смысле как структуры соответствующих факторов, так и природы лимфоцитарных рецепторов этих факторов представляют собой сегодня одну из наиболее интенсивно развивающихся областей иммунологии [14].

## АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Еще одна важная область интересов для иммунологов, занимающихся клеточными мембранами, это активация лимфоцитов [9]. Возникновение клеток иммунной системы, будь то клетки, продуцирующие антитела, или клетки, опосредующие различные реакции Т-лимфоцитов, включало также развитие способности неактивных лимфоцитов претерпевать деление и образование клонов специализированных в отношении различных эффекторов клеток. Очевидно, что названные процессы представляют собой мембранные явления, к которым наряду с другими относится и взаимодействие антигена с поверхностью клетки. Вероятно, в большинстве случаев для инициации активации необходимы совместно действующие митогены. Из-за наличия клонального отбора изучение молекулярной биологии активации лимфоцитов с помощью аутентичных антигенов затруднительно, поскольку они способны взаимодействовать лишь с малой субпопуляцией имеющих в наличии лимфоцитов. Поэтому особое внимание уделяется использованию модельных митогенов, вызывающих активацию всей или по крайней мере большей части изучаемой популяции лимфоцитов. В качестве таких моделей широко используются растительные лектины; некоторые из них избирательно стимулируют Т-лимфоциты, а другие — В-лимфоциты. Несмотря на значительное число работ в этой области, единодушие в вопросе фундаментальных механизмов активации все еще не достигнуто. Некоторые исследователи полагают, что важным условием активации является агрегация небольшого количества рецепторов клеточной мембраны, кластеризация которых приводит к образованию кальциевого канала. И действительно, некоторые кальцевые ионофоры могут имитировать процессы активации лимфоцитов; кроме того, известно, что многие агенты, способные вызывать активацию лимфоцитов, представляют собой многовалентные лиганды, провоцирующие агрегацию рецепторов на поверхности клетки. Другие ученые по-прежнему полагают, что фундаментальным механизмом активации может быть аллостерическое изменение мембранного рецептора. Более сложные теории предусматривают и одновременную агрегацию рецепторов.

## АНТИГЕНЫ ПОВЕРХНОСТИ ЛИМФОЦИТА

Тот факт, что иммунный ответ регулируется многими факторами, предусматривающими межклеточное взаимодействие, вызвал повышенный интерес к функциональным подвидам двух разных классов лимфоцитов: Т-клеток и В-клеток. Исследования в области разграничения функциональных подклассов концентрируются вокруг макромолекул клеточной мембраны, характерных для определенного подкласса, и базируются обычно на серологических методах. Некоторые из этих макромолекул (поверхностных маркеров) появляются в результате созревания лимфоцитов и их

нередко называют «антигенами дифференциации». Другие, например антиген *thy-1* всех Т-клеток, присутствуют во всех стадиях развития клеток данного типа. Выявление функций определенного подкласса клеток, содержащих характерный антиген, может быть проведено с помощью разрушения соответствующего подкласса благодаря использованию антитела и комплемента. В этом случае, например, обработка клеток антителами против *thy-1* и комплементом может продемонстрировать связь изучаемых явлений с Т-лимфоцитами. В последнее время для аналогичных исследований научились использовать фракции клеток, обогащенных определенным подклассом. В подобных экспериментах используется сортировщик клеток, действующий по принципу активации флюоресценции, что позволяет получить фракцию лимфоцитов, содержащих определенные поверхностные маркеры, и изучить свойства выделенного подкласса в различных экспериментах.

Химическое изучение белков, находящихся на наружной стороне лимфоцитарной мембраны, указывает на существование удивительно большого разнообразия макромолекул клеточной поверхности. По-видимому, многие из этих макромолекул выполняют различные функции, и уже сейчас ясно, что среди лимфоцитов существует значительная гетерогенность в обладании этими маркерами. Так, например, когда против некоторых из этих компонентов получают моноклональные антитела, то эти антитела взаимодействуют только с малой частью всей популяции лимфоцитов. Очевидно, что изучение природы и функций этих макромолекул клеточной поверхности, в особенности характерных не для всех, а только для некоторых лимфоцитов, будет представлять собой перспективную область для дальнейших исследований [17].

### ЛИМФОЦИТ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕМБРАННЫХ ЯВЛЕНИЙ

Хотя иммунологи уже овладели новыми методами изучения клеточных мембран для исследования некоторых важных проблем иммунологии, специалисты в области клеточной биологии все больше приходят к выводу о том, что лимфоцит представляет собой удобную модель клетки для изучения мембранных явлений в целом, т. е. явлений, выходящих за пределы сферы, собственно иммунологии. Лимфоциты могут быть достаточно просто и с малыми повреждениями получены в виде суспензионной культуры единичных клеток, что не так просто для большинства клеток млекопитающих. Это позволило в последние годы получить информацию о структуре мембран. Далее, многие реагенты могут служить в качестве проб для изучения структуры и функции мембран, например мышинных лимфоидных клеток. Очевидно, что интерес к лимфоцитам как модели клетки при изучении мембран и рецепторов будет расти и следующие разделы проиллюстрируют, какой интерес представляет использование лимфоцитов в качестве модели клетки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abney E. R., Parkhouse R. M. E.* Candidate for immunoglobulin D present on murine B lymphocytes.—*Nature*, 1974, 252, 600—602.
2. *Ada G. L., Byrt P.* Specific inactivation of antigen-reactive cells with <sup>125</sup>I-labelled antigen.—*Nature*, 1969, 222, 1291—1292.
3. *Burnet F. M.* A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection.—*Aust. J. Science*, 1957, 20, 67—69.
4. *Goding J. W., Layton J. E.* Antigen-induced co-capping of IgM and IgD-like receptors on murine B cells.—*J. Exp. Med.*, 1976, 144, 852—857.
5. *Marchalonis J. J.* Lymphocyte receptors for antigen.—*J. Med.*, 1974, 5, 329—367.
6. *Miller J. F. A. P.* Lymphocyte interactions in antibody responses.—*Int. Rev. Cytol.*, 1972, 33, 77—130.
7. *Naor D., Sulitzeanu D.* Binding of radioiodinated bovine serum albumin to mouse spleen cells.—*Nature*, 1967, 214, 687—688.
8. *Nossal G. J. V.* Antibody production by single cells.—*Br. J. Exp. Pathol.*, 1958, 39, 544—551.
9. *Nossal G. J. V.* B lymphocyte receptors and lymphocyte activation.—In: *International Cell Biology, 1976—1977*, p. 103. Rockefeller University Press, New York.
10. *Nossal G. J. V., Mäkelä O.* Elaboration of antibodies by single cells.—*Ann. Rev. Microbiol.*, 1962, 16, 53—74.
11. *Nossal G. J. V., Pike B. L., Stocker J. W., Layton J. E., Goding J. W.* Hapten-specific B lymphocytes, Enrichment, cloning, receptor analysis and tolerance induction.—*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1976, 41, 237—243.
12. *Ruff M. C., Sternberg M., Taylor R. M.* Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells.—*Nature*, 1970, 225, 553—554.
13. *Rosenthal A. S., Shevach E. M.* In: *The Role of Products of the Histocompatibility Gene Complex in Immune Responses*, ed. by D. H. Katz, B. Benacerraf, 1976, p. 335. Acad. Press, New York.
14. *Tada T., Taniguchi M., David C. S.* Suppressing and enhancing T-cell factors as I-region gene products: properties and the subregion assignment.—*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1976, 41, 119—128.
15. *Vitetta E. S., Uhr J. W.* Immunoglobulin receptors revisited.—*Science*, 1975, 189, 964—969.
16. *Wigzell H., Andersson B.* Cell separation on antigen-coated columns. Elimination of high rate antibody-forming cells and immunological memory cells. — *J. Exp. Med.*, 1969, 129, 23—26.
17. *Williams Alan F., Standring Ruth.* In: *Progress in Immunology*, 3. Australian Academy of Science/Elsevier North Holland, p. 41.

# КИНЕТИКА СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВ С РЕЦЕПТОРАМИ

## МЕМБРАННЫЙ ШУМ: МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ЛЕКАРСТВ

Д. КОЛКАХАУН  
(D. COLQUHOUN)

*Отдел фармакологии, Медицинская школа Госпитала св. Георга,  
Лондон SW170RE, Великобритания*

Измерение флюктуаций или «шума» относительно среднего ответа на введение определенных лекарств дает полезную информацию о механизме их действия со времени разработки этого метода Katz и Miledi [37, 38]. Эти авторы показали, что шум, индуцируемый лекарствами типа ацетилхолина в месте нервно-мышечного соединения, возникает на молекулярном уровне и отражает мгновенные изменения в числе открытых каналов, открываемых лекарством. До настоящего времени этим способом изучаются в основном лекарства, действующие по механизму открывания ионных каналов.

Большое преимущество этого метода в том, что он является одним из немногих методов определения кинетики действия агониста в отличие от равновесных эффектов. Для определения кинетики необходимо измерять скорость, с которой система приближается к равновесию (релаксирует) после некоего воздействия. В обычных кинетических экспериментах воздействие на систему прилагается извне, например в виде скачкообразного изменения температуры, концентрации или мембранного потенциала. Только последний из перечисленных методов был успешно использован при изучении нервно-мышечного соединения [2, 45], где до сих пор не удается достаточно быстро для кинетических экспериментов изменять концентрацию агониста. Однако ацетилхолиновые рецепторы в электрической ткани изучались и с помощью скачков концентраций, индуцируемых с использованием активируемых светом агонистов [42]. В экспериментах по изучению шума определяемая релаксация является следствием скорее спонтанных статистических отклонений от состояния равновесия, чем внешних воздействий. Очевидно, что в широком наборе условий можно ожидать совпадения временных констант, определенных из экспериментов по релаксации и по измерению шума [45]. Однако, если имеется несколько временных констант, их относительное значение будет различаться в этих двух типах экспериментов.

Дискуссии на эту тему, как и обсуждение других аспектов принципов и результатов анализа шума, представлены в работах Stevens [55], Anderson и Stevens [5], Colquhoun и Hawkes [25], Neher и Stevens [47] и Colquhoun [23]. Один из случаев, когда анализ шума может быть использован в качестве метода исследо-



вания, обсуждается в настоящей статье, где кратко изложены также современные представления о механизме действия лекарств, при изучении которых анализ шума может оказаться информативным.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛИЗА ШУМА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЛОЖНЫХ ТРАНСМИТТЕРОВ

Установлено, что мозговая ткань и узлы симпатических нервов способны ацетилировать и выделять различные аналоги холина, как и сам холин [10, 19]. Large и Rany [40] обнаружили, что после периода стимуляции препарата нерва скелетной мышцы крысы или лягушки в присутствии моноэтилхолина характеристики потенциалов концевой пластинки и спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки изменяются. Спонтанные миниатюрные токи концевой пластинки, измеренные по методу фиксации потенциала концевой пластинки, меняются сходным образом: амплитуда токов уменьшается и, как показано на рис. 9, А, временная постоянная их исчезновения также понижается. Эти наблюдения показывают, что ацетилирование моноэтилхолина происходит в нервном окончании и ацетилмоноэтилхолин выделяется в качестве ложного трансмиттера вместо ацетилхолина, причем

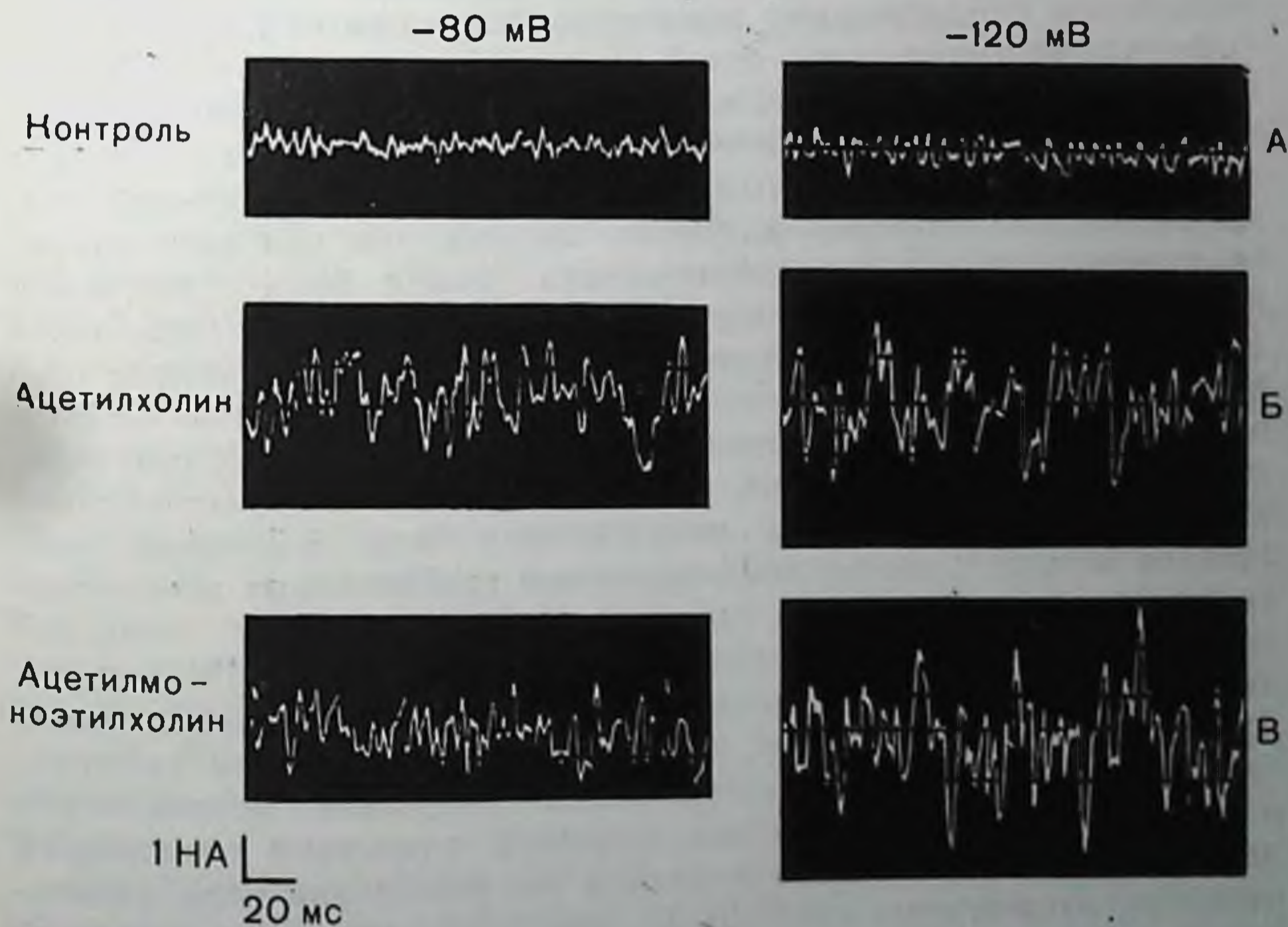


Рис. 8. Флюктуации тока концевой пластинки в диафрагме крысы. А — в отсутствие лекарства; Б — в присутствие ацетилхолина; В — в присутствии ацетилмоноэтилхолина. Приложенный потенциал — 80 мВ (левая колонка), 120 мВ (правая колонка). Печатается с разрешения «Journal of Physiology».

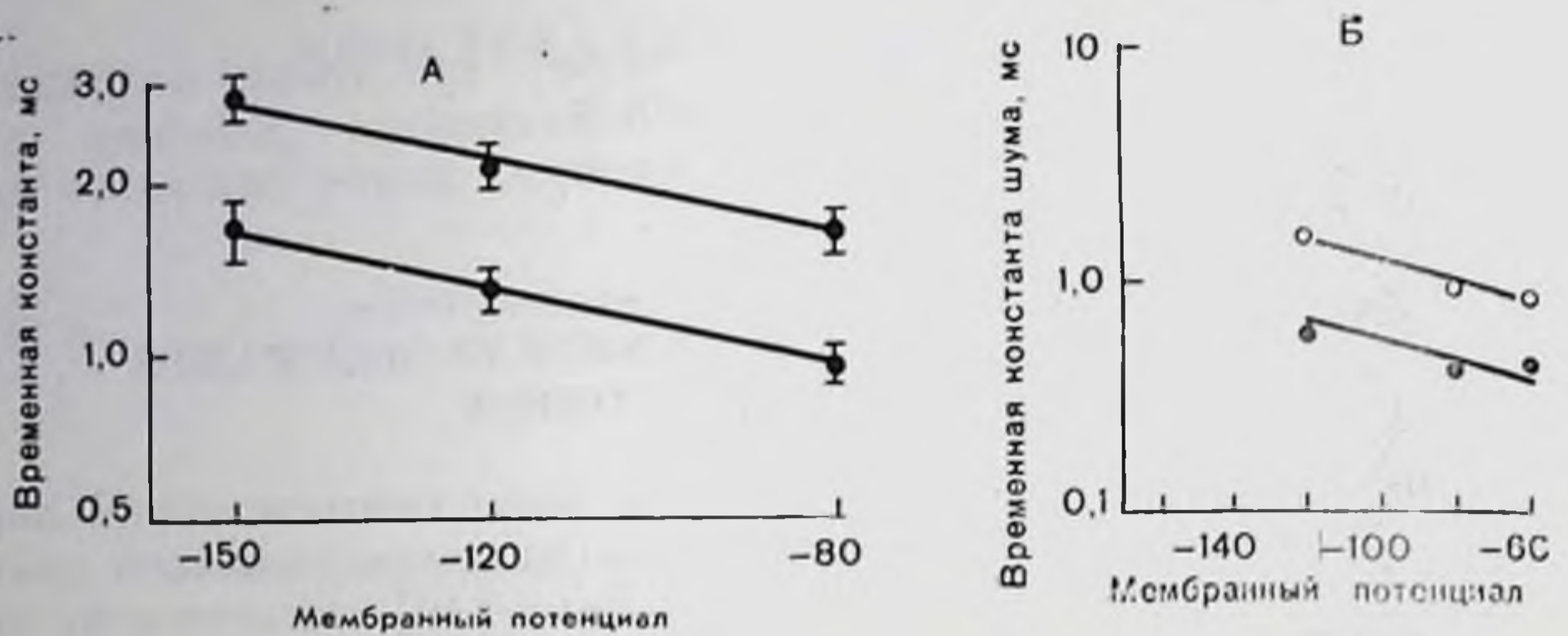


Рис. 9. Временные константы падения миниатюрных токов концевой пластинки как функции мембранного потенциала в концевых пластинках диафрагм крыс при фиксированном потенциале.

А — верхняя линия — нормальная мышца, нижняя линия — после обработки моноэтилхолином; Б — временные константы, полученные при измерениях мембранного шума, аналогичного показанному на рис. 8, как функции мембранного потенциала: верхняя линия — шум вызван ацетилхолином, нижняя линия — шум вызван ацетилмоноэтилхолином, введенными в инкубационную среду [27]. Печатается с разрешения «Journal of Physiology».

вызываемое им повышение проводимости концевой пластинки происходит быстрее, чем в случае ацетилхолина.

При внесении в инкубационный раствор концевых пластинок крысиной диафрагмы с фиксированным потенциалом ацетилмоноэтилхолина наблюдаемые относительно среднего уровня ответа флюктуации имеют точно такой же характер, как и при действии ацетилхолина [27]. Однако, как показано на рис. 8, эти флюктуации имеют для ацетилмоноэтилхолина большую частоту, чем для ацетилхолина. Спектральный анализ частоты флюктуаций подтверждает это наблюдение. Форма спектра как для ацетилмоноэтилхолина, так и для ацетилхолина может быть с разумным приближением описана всего лишь одной временной константой (иными словами, одной кривой Лоренца), однако значение этой константы для ацетилмоноэтилхолина составляет только  $56 \pm 5\%$  от соответствующей константы для ацетилхолина. При разумных допущениях это может быть интерпретировано как факт сходной зависимости времен жизни открываемых под действием этих агентов ионных каналов от напряжения при значении абсолютного времени жизни канала, открываемого в мембране концевой пластинки под действием ацетилмоноэтилхолина, на  $56\%$  меньше, чем для канала, открываемого под действием ацетилхолина (рис. 9, Б). Таким образом, наблюдение, что вслед за стимуляцией в присутствии моноэтилхолина константа исчезновения «ложных» миниатюрных токов концевой пластинки понижается до  $58 \pm 2\%$  от нормального значения без изменения вида зависимости от напряжения (рис. 9, А), наиболее просто может быть объяснено предположением, что: а) трансмиттер быстро уходит из щели и исчезновение миниатюрных токов концевой пластинки (как до, так и после обработки моноэтилхолином) определяется в основном скоростью закрытия ионного канала (в этом случае

соответствующая временная константа должна означать среднее время жизни открытого канала) [20]; б) «ложный» трансмиттер, выделяющийся после обработки моноэтилхолином, состоит в основном из ацетилмоноэтилхолина.

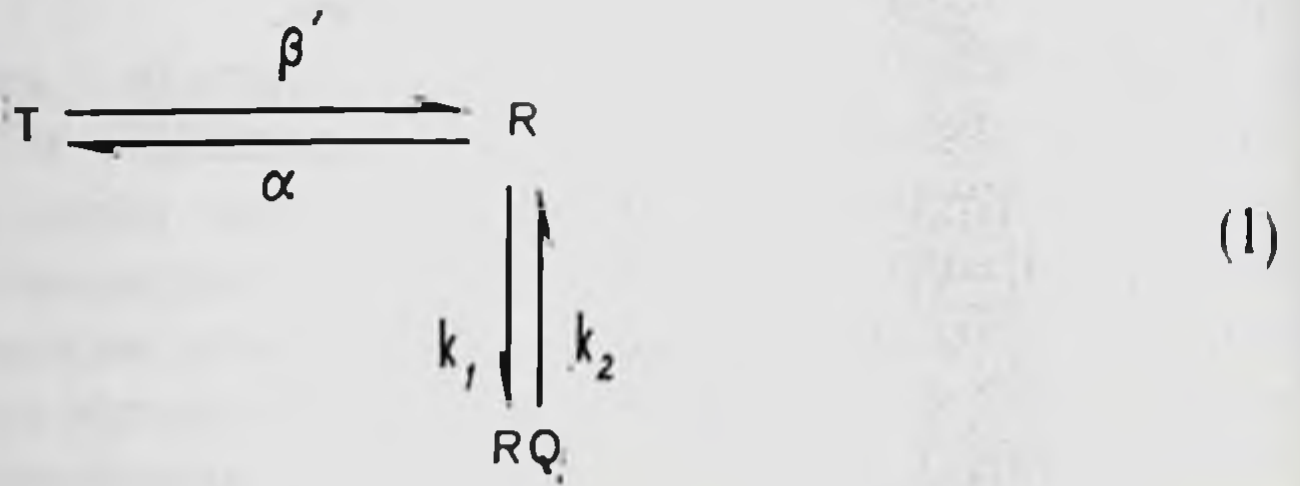
Обнаружено также, что амплитуда «ложных» миниатюрных токов концевой пластинки составляет 67% от нормальной. Это понижение может быть в принципе объяснено несколькими способами. Например, когда каналы открываются под действием ацетилмоноэтилхолина, они могут быть менее эффективными проводниками ионов, чем каналы, открываемые под действием ацетилхолина. Однако анализ шума показывает, что проводимость одиночного канала в открытом состоянии составляет 24,9 pS для ацетилхолина и 26,7 pS для ацетилмоноэтилхолина, поэтому предложенное объяснение не подходит. С другой стороны, можно предположить, что пониженная амплитуда «ложных» миниатюрных токов концевой пластинки объясняется пониженным родством ложного трансмиттера к соответствующим рецепторам по сравнению с ацетилхолином. Это объяснение представляется более вероятным, чем уменьшение общего числа молекул выделяющегося трансмиттера или пониженная способность ложного трансмиттера к открыванию каналов при связывании.

### БЛОКИРОВАНИЕ КАНАЛА КАК МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВА

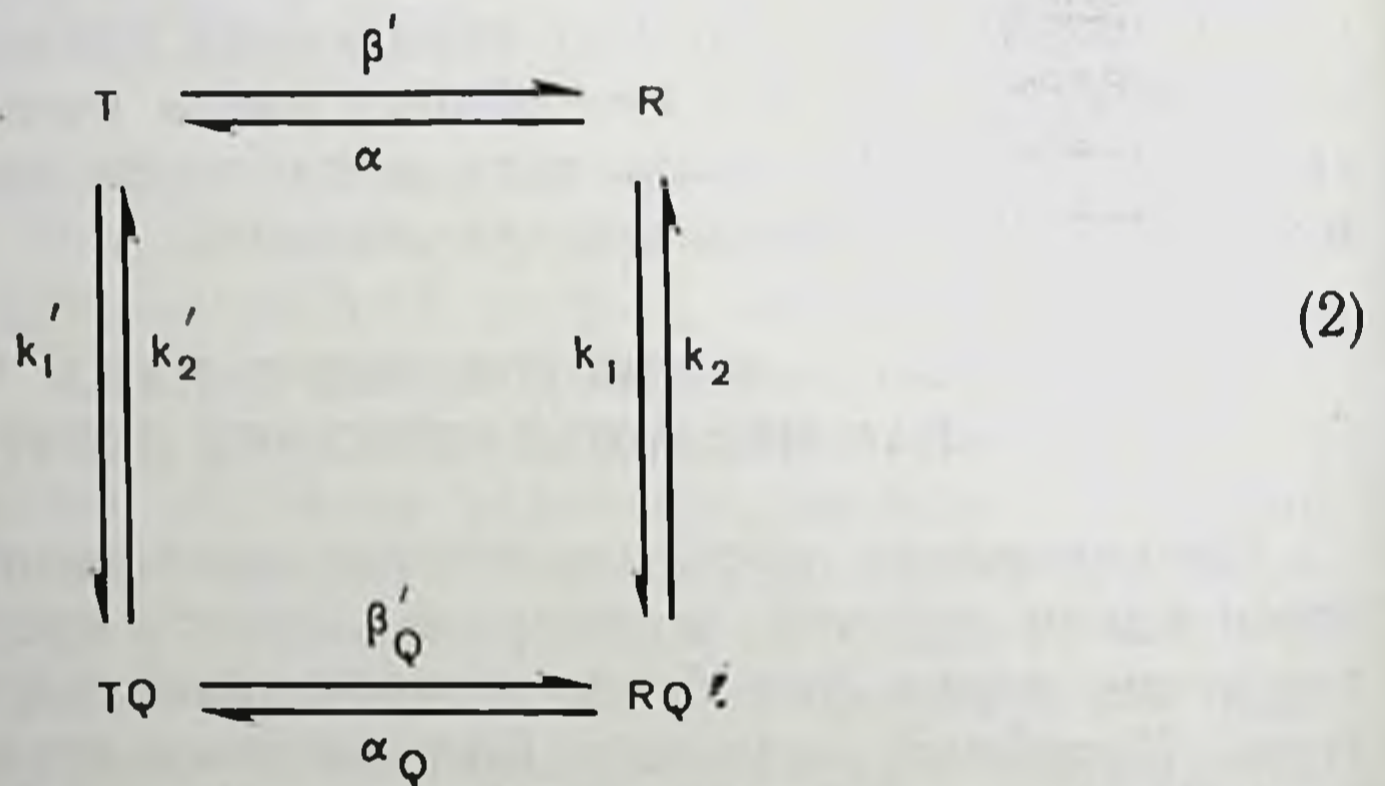
Блокирование открытых ионных каналов лекарствами, предположительно простой закупоркой канала, предотвращающей прохождение ионов, все более внимательно изучается в последние годы. Подобный механизм был впервые предложен (для синапсов) Blackman [15, 16], Blackman и Purves [17]. Уже появилось немало работ, в которых высказывается предположение, что некоторые агонисты способны проникать через ионные каналы мышечной концевой пластинки [28, 29, 57]. Идея блокирования каналов также была приложена к натриевым и калиевым каналам аксонов [6, 7, 36, 56, 60] и к ионным каналам мембран мышечных концевых пластинок при химическом возбуждении [1, 3, 4, 13, 50, 52, 53]. В последнее время на основании многочисленных данных — от весьма важных до почти незначимых — предполагается, что блокирование канала лежит в основе ряда разнообразных явлений, возникающих в результате действия местных анальгетиков, через частичный агонизм до полной десенситилизации. Интересно поэтому хотя бы кратко обсудить имеющиеся доказательства.

Большинство авторов пытались объяснить свои результаты, используя одну из следующих схем. В этих схемах  $T$  означает ионный канал в закрытом состоянии (нулевая проводимость),  $R$  — открытый канал с проводимостью  $\gamma_1$ ,  $Q$  — молекулу, которая может полностью или частично заблокировать открытый канал: проводимость тогда становится равной  $RQ = \gamma_2$ , где  $0 \leq \gamma_2 < \gamma_1$ . Если

лекарство может блокировать только открытые каналы и высвобождаться из них же, имеется следующая схема:



Некоторые авторы полагают, что заблокированный канал может переходить в конформацию, соответствующую закрытому состоянию, и блокирующий агент может непосредственно взаимодействовать с  $T$ , что приводит к более общей схеме:



В случае наличия регулируемого лекарством канала в перечисленных системах молекулы агониста могут, разумеется, быть связаны на своих рецепторах. Однако для простоты в большинстве работ детали механизма открывания канала и десенситилизации не рассматриваются. В случае наличия натриевого канала аксона в приведенные схемы должно быть введено инактивированное состояние.

Поведение четвертичных аммониевых соединений, по-видимому, не отличается такой сложностью, как механизм действия частично или полностью неонизованных соединений. Структуры ряда этих соединений, действие которых изучалось, приведены на рис. 10.

### Ионные каналы аксона

В миелинизированном аксоне четвертичный локальный анестетик QX314 блокирует натриевые каналы, в которые он, по-видимому, способен входить со стороны цитоплазмы, пока они находятся в

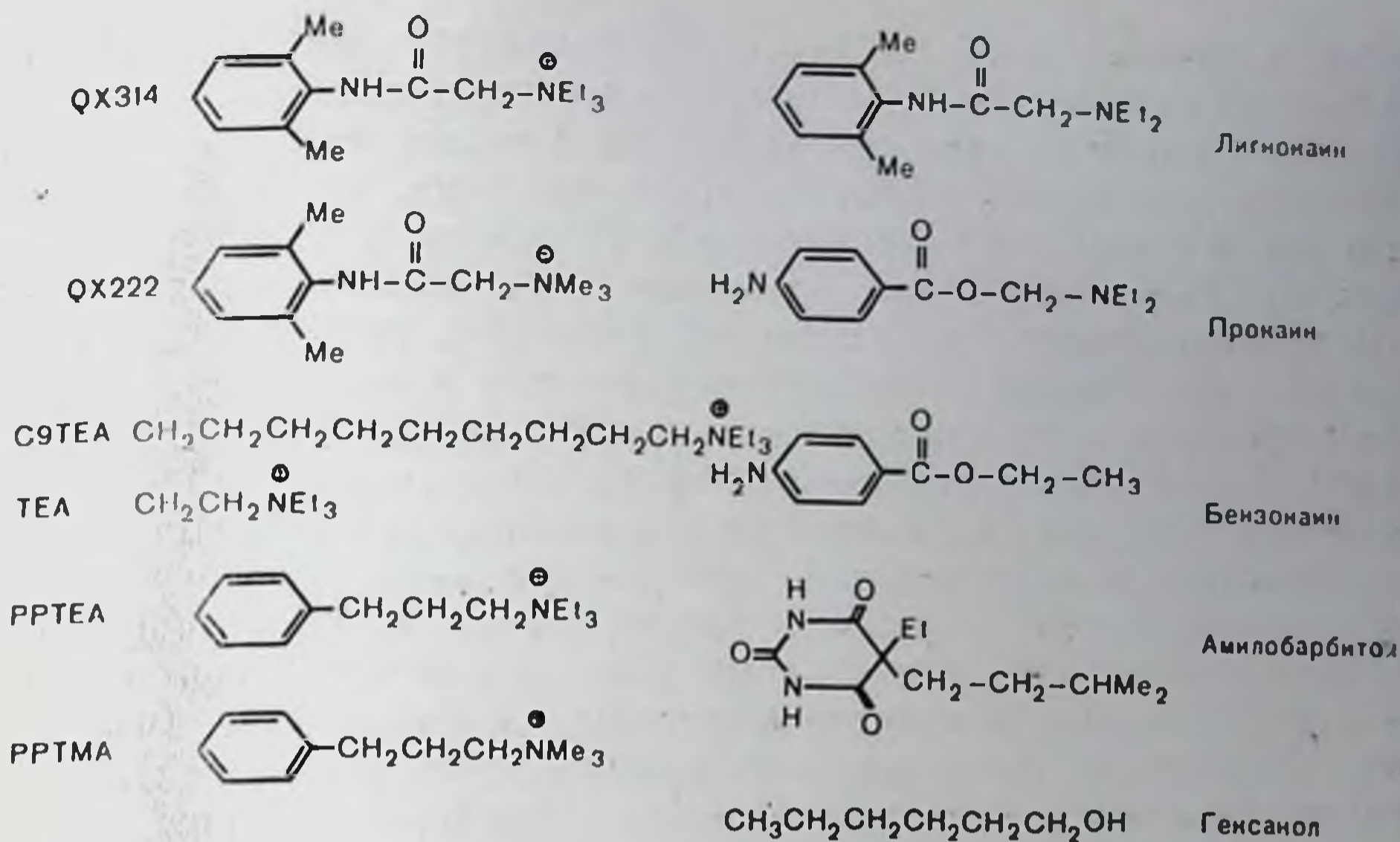


рис. 10. Структуры некоторых упомянутых в тексте соединений.

открытом состоянии [56]. Канал может затем закрыться, но лекарство вновь выйдет из него только в том случае, если канал опять откроется, так что в схеме  $2 k_1'$  и  $k_2'$  пренебрежимо малы. В соответствии с гипотезой Hille [35, 36] эта способность к выходу из канала зависит от гидрофобности кватернизованного состояния лекарства. Этот автор полагает, что неионизованные производные третичных лекарственных соединений типа прокаина или лекарства типа бензокаина, которые полностью не ионизованы при физиологических значениях pH, могут связываться и с закрытыми каналами или выходить из них, поскольку они могут достигать места действия благодаря своей гидрофобности, проходя непосредственно сквозь липидную мембрану. Ранее, в течение некоторого времени полагали, что частично ионизованные молекулы типа прокаина проникают через мембрану в неионизованном виде, но, находясь уже внутри аксона, действуют в своей катионной форме [48, 49].

Hille предположил [36], что оба типа молекул, как ионизованные, так и неионизованные, являются активными и связываются с тем же самым центром. Предположение, что вещества с разными зарядами действуют на том же самом связывающем центре, кажется удивительным, но Hille выдвинул весьма правдоподобное, хотя и неподкрепленное экспериментально объяснение этому положению. Это объяснение не содержит, однако, экспериментальных данных о взаимодействии между ионизованными и нейтральными молекулами, которые могли бы пролить свет на вопрос о том, могут ли оба типа молекул конкурировать за один связывающий центр. Mrose и Ritchie [44] такие эксперименты проделали. Они были основаны на принципе, состоящем в том, что смеси эквипотенциальных растворов двух лекарств при равновесии дол-

жны вызывать такой же ответ, что и каждый раствор одного лекарства сам по себе, но только в том случае, если оба лекарства конкурируют за один центр. Нам не известен ни один пример демонстрации полной общности этого принципа, но он подходит для любой схемы типа рассмотренной Colquhoun [21], как это следует из приведенного ниже уравнения 5. Он также удовлетворяет обобщениям теории, предложенной Hille [36]. Если мы предположим, что каждый канал существует в  $n$  взаимопереходящих конформациях и  $m$  лекарств конкурируют за один связывающий центр канала, то для описания процесса нам понадобится  $nm$  равновесных констант связывания ( $n$  для каждого лекарства) и  $n-1$  независимых равновесных констант для описания конформационных превращений. Иными словами, всего нам потребуется  $n(1+m)-1$  равновесных констант ( $2n-1$  для индивидуального лекарства меньше, чем число возможных переходов,  $n^2$ , вследствие ограничений, накладываемых циклическими реакциями). Мы можем выразить равновесную константу конформационного перехода в отсутствие лекарства как

$$K'_i = \frac{p_i}{p_{i-1}} \quad (2 \leq i \leq n), \quad (3)$$

где  $p_i$  — равновесная фракция системы в ее  $i$ -той конформации, или, что более удобно, как

$$K_i = \frac{p_i}{p_1} = \prod_{j=2}^{j=i} K'_j. \quad (4)$$

В присутствии лекарства  $p_{ir}$  можно определить как равновесную фракцию, занятую  $r$ -тым лекарством и находящуюся в  $i$ -той конформации, а  $p_{i0}$  как равновесную фракцию незанятых каналов в  $i$ -той конформации. Таким образом:

$$p_{ir} = p_{i0} c_{ir}, \quad (5)$$

где

$$c_{ir} = \frac{X_r}{K_{ir}} \quad (6)$$

представляет собой нормированную концентрацию ( $X_r$  — концентрация  $r$ -того лекарства, а  $K_{ir}$  — равновесная константа его связывания с каналом в  $i$ -той конформации). В условиях равновесия мы получаем (поскольку  $K_1 = 1$  по определению):

$$p_{i0} = \frac{K_i}{\sum_{i=1}^n K_i \left[ 1 + \sum_{r=1}^m c_{ir} \right]} \quad (7)$$

и выводим  $p_{ir}$  из уравнения 5. Соответствующая подстановка в полученный результат показывает, что если наблюдаемый ответ

системы может быть записан в виде монотонной функции любого сочетания  $p_{10}$  и (или)  $p_{1r}$ , то смеси в любых соотношениях и любого числа растворов лекарств равной эффективности должны давать такой же ответ, как и каждый раствор сам по себе. Mrose и Ritchie [44] установили, что смеси эквипотенциальных растворов частично ионизованных лекарств лидокаина (лигнокаина) и маркаина (бупивакаина) подчиняются сформулированному выше принципу, как и смеси неионизованных лекарств — бензокаина и бензилового спирта. Однако смеси лидокаина и бензокаина или лидокаина и бензилового спирта дают больший ответ, чем отдельные растворы. Это означает, что указанные пары действуют не только по механизму конкуренции за один центр (бензокаин может конкурировать за лидокаиновый центр, но, как можно предположить на основании полученных результатов, если он действительно делает это, то он должен вызывать дополнительные анестетические эффекты). Достижение действительного положения равновесия в случае местных анестетиков может представлять собой проблему, если метод, используемый для оценки их действия, подразумевает изменения мембранного потенциала, поскольку их действие зависит от этого потенциала.

Действие этих местных анестетиков на натриевый канал аксона отличается от действия тетродотоксина или сакситоксина, которые обладают гораздо большим сродством к натриевому каналу и блокируют его в катионной форме с наружной стороны аксона, связываясь с центром, который отличается, по-видимому, от центра связывания местных анестетиков [14, 26, 34, 59].

Калиевый ток в аксонах также блокируется рядом соединений: кватернизованными соединениями типа ТЕА (радиус которого близок к радиусу  $K^+$  с одной гидратационной оболочкой), С9ТЕА и РРТЕА (см. рис. 10), а также 4-аминопиридином [58]. И в данном случае принято полагать, что эти соединения блокируют калиевые каналы. Кватернизованные соединения, по-видимому, входят в ионный канал аксона со стороны цитоплазмы, когда этот канал открыт; равновесная константа в этом случае составляет порядка 20 мкМ. Схема 2 для случая, когда  $k_1'$  и  $k_2'$  пренебрежимо малы, удовлетворяет полученным результатам [7]. Указанные соединения более эффективно блокируют ток  $K^+$ , направленный наружу, чем внутрь. В миелинированном нерве, однако, ТЕА очень эффективен и при наружном применении, хотя в этом случае и действует предположительно на особом внешнем центре независимо от того, закрыт или открыт канал [8]. Эффект внутреннего ТЕА и, что еще более очевидно, С9ТЕА и РРТЕА (см. рис. 10), которые содержат гидрофобные группы, соединенные с молекулой ТЕА, заключается в инактивации направленного наружу калиевого тока, что напоминает нормальную картину для натриевого тока. Препарат QX314 также может оказывать подобное действие [56].

В дополнение к действию перечисленных выше молекул натриевые и калиевые токи в аксонах понижаются под влиянием

ряда других соединений, для которых специфическую способность блокировать каналы представить труднее. К этим соединениям относятся трихлорэтилен, галотан, спирты и барбитураты [51].

### Ионные каналы мышечной концевой пластинки

Тетродотоксин не оказывает действия на эти каналы, но некоторые из приведенных на рис. 10 соединений такой эффект дают. Steinbach [52, 53] предположил, что некоторые местные анестетики действуют на концевую пластинку преимущественно за счет связывания с некоторыми из «активированных рецепторов», т. е. когда ионный канал открыт. Кинетика канала в присутствии местных анестетиков была изучена методом релаксации скачка потенциала [2, 4] и по измерениям шума [39, 50]. Недавно удалось также определить ток через индивидуальные каналы [46]. Методы шума и релаксации также предполагают применимость теоретической схемы типа схемы 2, хотя не появилось еще ни одного эксперимента по измерению шума, в котором схемы 1 или 2 были бы подтверждены прямо и количественно и экспериментальные константы скоростей совпадали бы с рассчитанными теоретически. Adams показал, что для катеринизованного местного анестетика QX222 взаимосвязь между миниатюрными токами концевой пластинки и шумом соответствовала ожидаемой из схемы 1, хотя в нее и пришлось ввести некоторые изменения, чтобы объяснить и полученные ранее результаты Beam [13]. Изучая методом релаксации скачка потенциала свойства третичного местного анестетика проканна, Adams [4] показал, что его кинетические результаты соответствуют схеме 1; на основании их можно было предположить, что равновесная константа связывания проканна с открытым каналом составляла около 20 мкМ при мембранном потенциале — 80 мВ. Однако Adams обнаружил в экспериментах, что концентрация, необходимая для уменьшения равновесного тока наполовину, также составляет около 20 мкМ, что не совпадает со схемой 1. Более общая схема 2 показывает, что в положении равновесия, как следует из уравнения 7, фракция  $p_R$  открытых и незаблокированных каналов в присутствии блокатора  $Q$  в концентрации  $x_Q$  будет составлять:

$$p_R = \frac{1}{(x/\beta')(1 + c'_Q) + (1 + c_Q)}, \quad (8)$$

где нормированные концентрации составляют  $c_Q = x_Q/K_Q$  и  $c'_Q = x_Q/K'_Q$ , а константы связывания  $Q$  для открытого и закрытого состояний канала составляют соответственно  $K_Q = k_2/k_1$  и  $K'_Q = k'_2/k'_1$ , если предположить независимость процесса от связывания агониста. Константа  $\beta'$  будет, разумеется, зависеть от концентрации агониста, например будучи равной  $\beta' = \beta x_A (x_A + K_{AT})$  в схеме A у Colquhoun [23] или  $\beta' = \beta (x_A/K)^n$  в низкоконцентрационном аппроксимировании у Anderson и Stevens [5], где  $x_A$  представляет собой концентрацию агониста, а  $\beta$  — истинную



(микроскопическую) константу скорости перехода канала из закрытого состояния в открытое. Если блокатор селективен по отношению к открытым каналам, то уравнение 8 приобретает вид:

$$P_R = \frac{1}{(\alpha/\beta') + (1 + c_Q)} \quad (9)$$

В случае, когда агонистом открыто небольшое число каналов, как, например, при концентрациях агониста, обычно неиспользуемых в нервно-мышечном соединении, реализуется соотношение  $(\alpha/\beta') \gg 1$  и уравнение 9 показывает, что для заметного понижения тока будет необходима концентрация селективного блокатора, намного большая константы равновесия  $K_Q$  (если допустить, что заблокированные каналы полностью теряют свою проводимость,  $\gamma_2 = 0$ ). С другой стороны, как это следует из уравнения 8, неселективный ( $K_Q \approx K'_Q$ ) антагонист должен понижать равновесный ток в концентрациях порядка  $K_Q$ . Именно по этой причине Adams [4] сделал вывод о неселективном действии прокана. В противоположность этому эксперименты на нейронах *Aplysia* [9, 43] показали, что не только проканн, но и тубокурарин и гексаметоний действуют в основном как селективные блокаторы каналов. Было, например, обнаружено, что тубокурарин связывается с открытым каналом с  $K_Q \approx 0,25$  мкМ, что поразительно близко к величине связывания с рецептором ацетилхолина у лягушек и млекопитающих (см. например, обзоры Colquhoun [22, 23]), но для блокирования равновесного ацетилхолинового тока требовались концентрации порядка 500 мкМ. Adams [3] предположил, что некоторые барбитураты также связываются с открытыми каналами достаточно селективно. Так, например, амфибарбитон (см. рис. 10) связывается с  $K_Q = 7,3$  мкМ, но для блокирования индуцированных агонистом токов необходимы гораздо более высокие концентрации. В этих экспериментах активной является, по-видимому, нейтральная, а не анионная форма и предполагаемое взаимодействие лекарства с открытым каналом не зависит от напряжения.

Полезно заметить, что если нейтральная форма прокана является столь же эффективным блокатором, как и катионная (как это постулировано Hille [36] для аксона), то интерпретация результатов экспериментов со скачками потенциала будет затруднена, поскольку, очевидно, только заряженная форма лекарства будет демонстрировать зависимость от напряжения связывание.

Neher и Steinbach [46] провели точные эксперименты по записи токов через индивидуальные каналы в денервированной мышце лягушки, используя в качестве агониста суберилхолин. Агонист сам по себе вызывает квадратные импульсы тока при открывании и закрывании каналов. В присутствии же местного анестетика QX222 нормальный квадратный импульс превращается во всплеску коротких открытий. Все эти результаты совместимы с простым селективным блокированием открытых каналов, показанным на схеме 1. Быстрое открывание и закрывание во время всплески было интерпретировано как блокирование и деблокиро-

вание открытых каналов. Наблюдение, что продолжительность вспышки больше, чем нормального открывания, заставляет предположить, что блокатор селективен по отношению к открытому каналу. Такая селективность будет выражаться в сдвиге равновесия к открытому состоянию, так что основным результатом низкой концентрации блокатора будет понижение числа закрытых каналов и увеличение числа заблокированных каналов; при этом фракция открытых (деблокированных) каналов (или общий ток во время вспышки) будут изменяться относительно мало. Именно по этой причине для блокирования в состоянии равновесия индуцированного агонистом тока потребуются концентрации агента, гораздо большие, чем  $K_D$ . Авторы, разумеется, отмечают, что медленное закрывание заблокированных каналов определить не удастся, как это было отмечено и Adams [4].

### *Проводимость единичного канала в присутствии блокаторов канала*

Согласно результатам изучения единичных каналов Neher и Steinbach [46] проводимость единичного канала, пока канал не был заблокирован, не отличалась от обычного значения ( $\gamma_1 \approx 30$  pS), а в процессе блокирования проводимость вообще не регистрировалась ( $\gamma_2 < 0,05 \gamma_1$ ). Этот результат можно сравнить с данными Ruff [50], что определенная из экспериментов с шумом проводимость одиночного канала понижается в присутствии QX222 и составляет от 6 до 60% нормы. Каковы возможные причины этого явления? Во-первых, регулируемые ацетилхолином каналы в иннервированной мышце могут обладать проводимостью незаблокированного канала  $\gamma_1$ , понижающейся в присутствии QX222, хотя под действием суберилхолина в денервированной мышце этого может не происходить. Этот эффект может предположительно происходить за счет самостоятельного действия анестетика (например, на мембранные липиды) наряду с его основным действием как блокатора каналов. Во-вторых, вариабельность тока может быть недооценена из-за потери высоких частот вследствие недостаточно широкой чувствительности регистрирующей аппаратуры. Ruff представляет доказательство, что в его измерениях не происходит существенных потерь тока (площадь под спектром шума) при условии, что две наблюдаемые компоненты шума — единственные. Для того чтобы можно было применить это объяснение, мы должны допустить существование третьего регистрируемого компонента, а если он существует, то в предложенный механизм придется внести некоторые изменения. В-третьих, если заблокированный канал имеет пониженную, но не нулевую проводимость  $\gamma_2$ , то будет наблюдаться некая средняя проводимость, меньшая, чем  $\gamma_1$ . Кажущаяся проводимость единичного канала  $\gamma_{\text{каж}}$  во всех работах определяется из соотношения:

$$\gamma_{\text{каж}} = \frac{\text{var}(I)}{m_1(V - V_{\text{eq}})}, \quad (10)$$

где  $\text{var}(I)$  и  $m_I$  — изменение и среднее наблюдаемого индуцируемого лекарством тока при значении мембранного потенциала  $V$ ;  $V_{\text{eq}}$  — обратный потенциал. При использовании уравнения 10 предполагается, что лишь малая часть каналов находится в проводящем состоянии. Это выражение в общем виде (например, из уравнения 54 работы [25] Colquhoun и Hawkes) выглядит так:

$$\gamma_{\text{каж}} = \frac{\sum p_i \gamma_i^2}{\sum p_i \gamma_i} - \sum p_i \gamma_i, \quad (11)$$

где  $p_i$  представляет собой равновесную фракцию  $i$ -того проводящего состояния;  $\gamma_i$  — его проводимость. Это же может быть записано в нормированном виде, что позволяет выразить кажущуюся проводимость как долю проводимости незаблокированных каналов:

$$\frac{\gamma_{\text{каж}}}{\gamma_1} = \frac{1 + \sum p_i g_i^2}{1 + \sum p_i g_i} - s \frac{(1 + \sum p_i g_i)}{1 + \sum p_i}, \quad (12)$$

где суммированы все другие проводящие состояния, отличные от открытых каналов  $p_i = p_i/p_1$ ;  $g_i = \gamma_i/\gamma_1$  и  $s$  — общая доля каналов, находящихся в любом из проводящих состояний. Из уравнения 12 в общем виде можно сделать следующие выводы: А. Если все состояния, отличные от открытых, разблокированных каналов, имеют нулевую проводимость, то  $\gamma_{\text{каж}}/\gamma_1 = 1 - p_1$ ; иными словами, нормальная проводимость будет наблюдаться, когда небольшое количество каналов открыто и разблокировано, т. е.  $p_1 \ll 1$ , как в случае нервно-мышечного соединения. При этом не имеет значения, как много каналов открыто, но заблокировано; пока  $p_1$  и, следовательно, наблюдаемый ток малы, тот факт, что для появления тока может потребоваться высокая концентрация агониста, не должен влиять на ожидание нормальной проводимости. Б. Если общая доля  $s$  проводящих каналов очень мала, то второй член в уравнениях 12 и 11 также пренебрежимо мал, и можно использовать вырожденную форму уравнений, как это делал, например, Ruff [50]. В. Если проводящие состояния существуют с проводимостью меньшей, чем  $\gamma_1$  (например, заблокированное состояние с проводимостью  $\gamma_2$ ), можно предсказать, что значение  $\gamma_{\text{каж}}$  понизится. Графики на рис. 11 и 12 рассчитаны из уравнения 12 для случая двух проводящих состояний. Очевидно, что проводимость  $\gamma_{\text{каж}}$  не может быть меньше, чем  $\gamma_2$ , и, пока доля заблокированных каналов намного больше доли незаблокированных (открытых) каналов (в этом случае должно наблюдаться очень большое различие между скоростями быстрой и медленной компоненты),  $\gamma_{\text{каж}}$  никогда не должно быть намного меньше, чем  $\gamma_1$ , независимо от значения  $\gamma_2$ . Если константы скоростей, наблюдавшиеся Neher и Steinbach для QX222, достаточно справедливы и для экспериментов Ruff, то в случае последних отношение числа заблокированных каналов к числу открытых не могло быть очень большим.

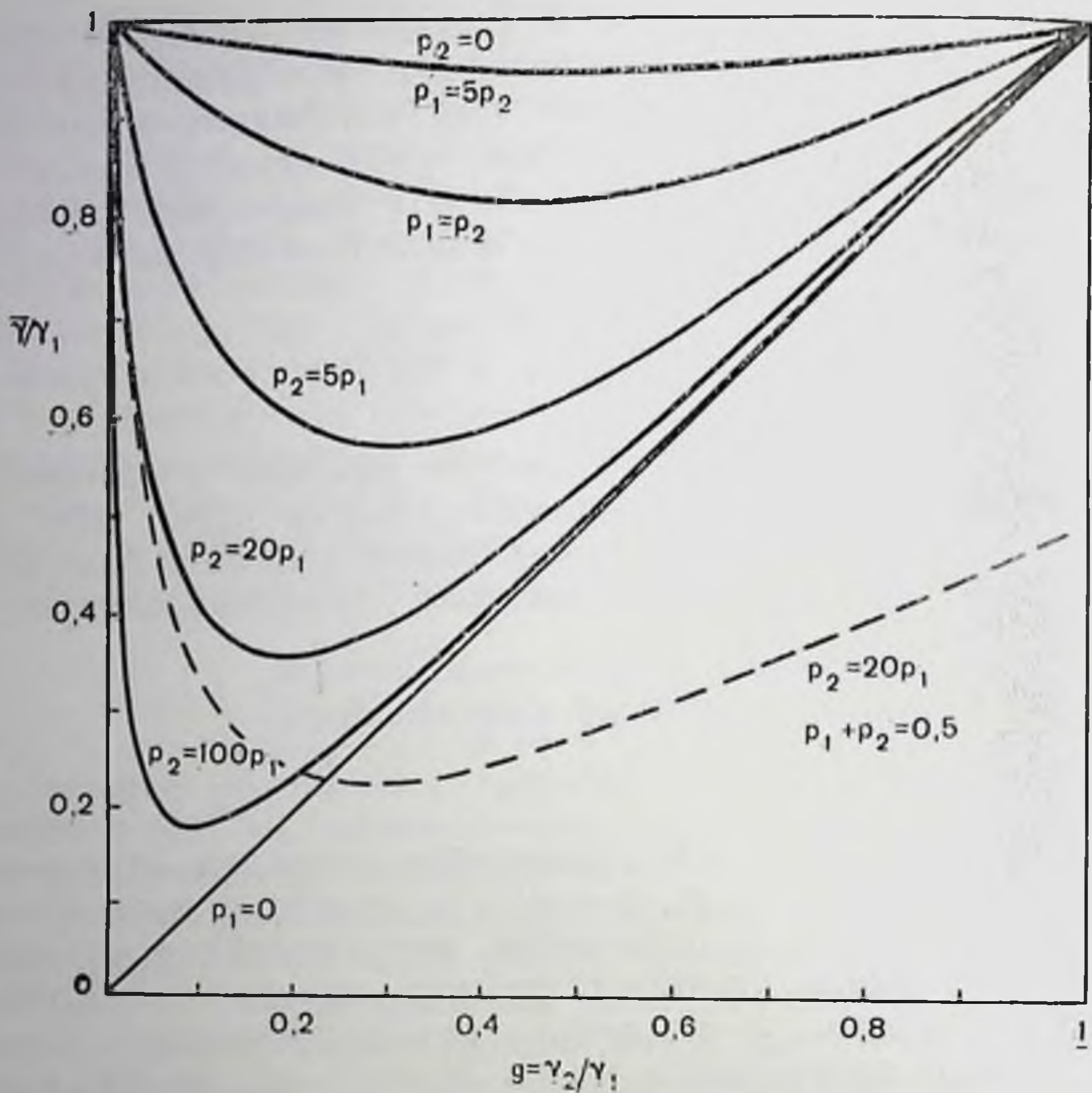


Рис. 11. Теоретические кривые, рассчитанные по уравнению 12 для случая двух проводящих состояний.

По оси ординат — доля кажущейся проводимости одиночного канала  $\bar{\gamma}$  (рассчитанная по уравнению 12 в предположении об изменении отклонений без потерь в диапазоне высоких частот) от общей проводимости  $\gamma_1$ , по оси абсцисс — относительная проводимость заблокированных ( $\gamma_2$ ) и неблокированных ( $\gamma_1$ ) открытых каналов. Кривые построены для различных относительных долей неблокированных ( $p_1$ ) и заблокированных ( $p_2$ ) каналов. Все кривые построены в допущении, что  $s = (p_1 + p_2) = 1$ , за исключением пунктирной линии, для которой  $p_1 + p_2 = 0,5$ . Эта линия приближается к значению 0,95 ( $= 1 - p_1$ ), по мере того как  $\gamma_2$  приближается к 0, а когда  $\gamma_2 < 0,1$ , то  $\gamma_1$  приближается к соответствующей сплошной.

Тем не менее и сейчас остается неясным, как объяснить пониженную кажущуюся проводимость одиночного канала, наблюдаемую при действии QX222. Ни одна из приведенных выше возможностей не кажется достаточно привлекательной. В некоторых случаях в присутствии лекарств, которые предположительно должны блокировать ионные каналы, удавалось наблюдать нормальные значения  $\gamma_{\text{каж}}$  (например, в случае атропина и мышши лягушки [31], тубокурарина, проканна и нейронов *Aplysia* [9, 43]).

#### Возможность блокирования каналов агонистами

Creese и соавт. предполагают, что декаметоний способен войти в каналы и открывать сам себя. Если это действительно так, то прохождение  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  должно быть затруднено, пока дека-

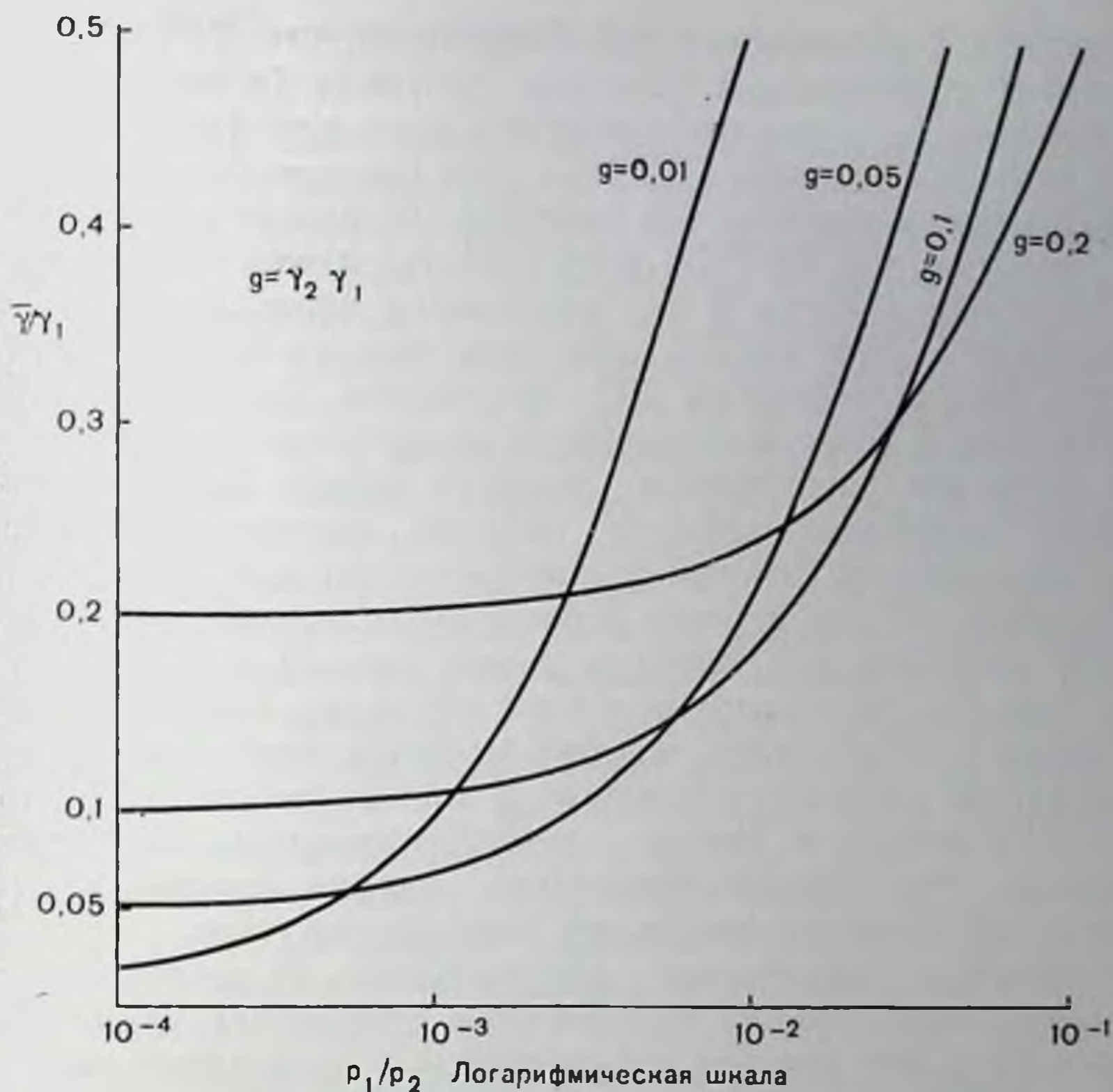


рис. 12. Кажущаяся проводимость как функция  $r_1/r_2$  для различных значений  $\gamma_2/\gamma_1$ , рассчитанных по уравнению 12 для случая двух проводящих состояний.

Такое представление результатов противоположно показанному на рис. 11. На графике  $r_1/r_2$  отложено по логарифмической шкале, причем отложены лишь малые величины этого отношения (максимально открытые каналы, которые скорее заблокированы, чем незаблокированы), чтобы показать приближение  $\bar{g}$  к  $\gamma_2$  при  $r_2 > r_1$ . Все кривые построены в предположении, что большинство каналов находится в непроводящем состоянии ( $s < 1$ ), как и для сплошных линий, представленных на рис. 11.

метоний находится в ионном канале. Colquhoun и соавт. [24] измерили мембранный шум, возникающий при действии суберхолина, ацетилхолина, РРТМА (см. рис. 10) и НРТМА (м-оксипроизводное РРТМА). Два последних соединения были синтезированы Barlow, который обнаружил, что они являются эффективными никотиновыми агонистами в *rectus abdominis* мышцы лягушки [12] и очень эффективными стимуляторами ганглиев, причем НРТМА — наиболее активное и специфичное соединение [11]. Те же авторы установили, что НРТМА блокирует первичную передачу в диафрагме крыс с интенсивностью, близкой к интенсивности декаметония. Из рис. 10 видно, что указанные соединения очень близки по структуре РРТМА, одному из наиболее эффективных блокаторов Armstrong для калиевого канала в аксоне, а также подобны по структуре четвертичным местным

анестетикам. Varlow и соавт. [11] обнаружили, что РРТБА представляет собой эффективный блокатор ганглиев (в кишечнике морских свинок); дозовые эксперименты показали (при использовании в качестве агониста НРТМА), что его константа связывания с никотиновыми рецепторами ганглиев составляет 0,6 мкМ. Также было показано, что НРТМА и РРТМА вызывают появление двухкомпонентного спектра и что кажущаяся проводимость единичного канала в этом случае ниже, чем для ацетилхолина и большинства других агонистов [24]. Отмеченное выше структурное подобие делает более достоверными предположения, что агонисты могут изменять «доступность ионов в канал» благодаря своему действию, подобному эффекту местных анестетиков. Может ли в действительности простое блокирование открытых каналов быть достаточным для достижения наблюдаемых низких значений, пока остается неясным (см. выше, а также рис. 11 и 12). Соображения о том, что некоторые агонисты могут не только открывать каналы, но и действовать, подобно местным анестетикам, получило некоторую поддержку Sakmann и Adams (частное сообщение), а также Colquhoun и Dreyer (неопубликованные наблюдения), считающих, что гиперполяризующие скачки потенциала в присутствии декаметония вызывают мембранные токи, отличные от возникающих в присутствии ацетилхолина. В последнем случае после омического скачка наблюдается повышение входного тока по мере того, как каналы открываются в результате гиперполяризации, тогда как декаметоний вызывает быстрое понижение входного тока, подобно наблюдаемому в случае смесей суберилхолина и прокаина [4].

Если некоторые агонисты действительно блокируют каналы, возможно, что именно этим их свойством может быть до некоторой степени объяснено явление частичного агонизма, хотя этого далеко не достаточно для объяснения всех ранее проведенных наблюдений, обзор которых сделан Colquhoun [21]. До настоящего времени общепринято мнение, что отсутствие эффективности [54] связанного лекарства в вызывании ответа может объясняться неблагоприятным равновесием между закрытыми (но запятыми) и открытыми каналами [18]. Это может, например, объясняться малой селективностью агониста по отношению к рецептору в открытой конформации [21]. В последнем случае справедливо, что чем большую кооперативность необходимо постулировать, тем более узким будет интервал соответствующих аффинностей (для открытого и закрытого состояний; обозначение  $M$  см. у Colquhoun [24]), который необходимо использовать для объяснения перехода от антагониста к полному агонисту. Пока определенно не показано, что какой-либо из известных агонистов попадает (или не попадает) в этот интервал. Точно так же пока отсутствует даже предположение, какой механизм применим к гладкой мышце и может объяснить основную массу количественных данных по частичным агонистам.

В приведенной выше дискуссии основное внимание уделялось действию лекарств на рецепторы и ионные каналы, что объясняется недавно полученными результатами (и модой). Имеются ли какие-нибудь данные о том, что некоторые стороны действия лекарств могут определяться их влиянием на мембранные липиды? Резкие переходы в узком температурном интервале в проводимости единичных каналов (но не во времени их жизни) в концевых пластинках мышцы [30] и мышцах пиявки [41] определенно указывают на наличие фазовых переходов в мембранах. И разумно ли полагать, что общие анестетики и простые спирты также действуют по механизму блокирования ионных каналов? Если, как предполагалось, нейтральные барбитураты [3] и нейтральный прокаин [35, 36] действительно могут действовать именно так, то почему это не может быть правильным и в отношении этанола или галотана? Некоторые из этих соединений уменьшают миниатюрные токи концевых пластинок, другие увеличивают их, а гексанол вызывает бифазное падение, подобно прокаину [32]. Октанол умеренно повышает проводимость единичного канала [33]. Известно, что многие из этих соединений вызывают изменения мембранных липидов, однако пока неясно, является ли это причиной изменений поведения ацетилхолиновых рецепторов или же более важно прямое действие лекарств на рецептор или канал. Gage предложил несколько убедительных доводов в пользу объяснения эффекта простых соединений через их действие на мембрану. Это было показано исходя из результатов экспериментов по изменению текучести и диэлектрической постоянной мембранных липидов [32]. И все еще остается необходимость показать, что другие лекарства, действие которых обсуждалось выше, особенно некваaternизованные соединения, действуют только по одному пути и что влияние некоторых из них на мембранные липиды, несомненно имеющее место, несущественно в сравнении с их прямым действием на рецептор или ионный канал.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams P. R. A model for the procaine end plate current.—*J. Physiol.*, 1974, 246, 61—63P.
2. Adams P. R. Kinetics of agonist conductance changes during hyperpolarization at frog end-plates.—*Br. J. Pharmacol.*, 1975, 53, 308—310.
3. Adams P. R. Drug blockade of open end-plate channels.—*J. Physiol.*, 1976, 260, 531—532.
4. Adams P. R. Voltage jump analysis of procaine action at frog end-plate.—*J. Physiol.*, 1977, 268, 291—318.
5. Anderson C. R., Stevens C. F. Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction.—*J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 235, 655—691.
6. Armstrong C. M. Time course of TEA<sup>+</sup>-induced anomalous rectification in squid giant axons.—*J. Gen. Physiol.*, 1966, 50, 491—503.

7. *Armstrong C. M.* Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons.—*J. Gen. Physiol.*, 1971, 58, 413—437.
8. *Armstrong C. M., Hille B.* The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier.—*J. Gen. Physiol.*, 1972, 59, 388—400.
9. *Ascher P., Marty A., Neild T. O.* The mode of action of antagonists on the excitatory response to acetylcholine in *Aplysia* neurones.—*J. Physiol.* (in press), 1978.
10. *Barker L. A., Mittag T. W.* Comparative studies of substrates and inhibitors of choline transport and choline acetyltransferase.—*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975, 192, 86—94.
11. *Barlow R. B., Bowman F., Ison R. R., McQueen D. S.* The specificity of some agonists and antagonists for nicotine-sensitive receptors in ganglia.—*Br. J. Pharmacol.*, 1974, 51, 585—597.
12. *Barlow R. B., Thompson G. M., Scott N. C.* The affinity and activity of compounds related to nicotine on the rectus abdominis muscle of the frog (*Rana pipiens*).—*Br. J. Pharmacol.*, 1969, 37, 555—584.
13. *Beam K. G.* A quantitative description of end-plate currents in the presence of two lidocaine derivatives. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1976, 258, 301—322.
14. *Benzer T. I., Raftery M. A.* Partial characterization of a tetrodotoxin-binding component from nerve membrane.—*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 3634—3637.
15. *Blackman J. G.* The pharmacology of depressor bases. Ph. D. thesis, University of New Zealand, 1959.
16. *Blackman J. G.* Dependence on membrane potential of the blocking action of hexamethonium at a sympathetic ganglion synapse.—*Proc. Univ. Otago Med. School*, 1970, 48, 4—5.
17. *Blackman J. G., Purves R. D.* Ganglionic transmission in the autonomic nervous system.—*NZ Med. J.*, 1968, 67, 376—384.
18. *Castillo J. Del, Katz B.* Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives.—*Proc. R. Soc. B.*, 1957, 146, 369—381.
19. *Collier B., Barker L. A., Mittag T. W.* The release of acetylated choline analogues by a sympathetic ganglion. — *Mol. Pharmacol.*, 1976, 12, 340—344.
20. *Colquhoun D.* Lectures on Biostatistics. Clarendon Press, 1971, Oxford.
21. *Colquhoun D.* The relation between classical and cooperative models for drug action. — In: *Drug Receptors*, ed. by H. P. Rang, 1973, p. 149—182. Macmillan, London.
22. *Colquhoun D.* Mechanisms of drug action at the voluntary muscle end-plate. — *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1975, 15, 307—325.
23. *Colquhoun D.* The link between drug binding and response: theories and observations. — In: *The Receptors: A Comprehensive Treatise*, ed. by R. D. O'Brien, 1978. Plenum Press, New York.
24. *Colquhoun D., Dionne V. E., Steinbach J. H., Stevens C. F.* Conductance of channels opened by acetylcholine-like drugs in muscle end-plate.—*Nature*, 1975, 253, 204—206.
25. *Colquhoun D., Hawkes A. G.* Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug — operated ion channels. — *Proc. R. Soc. B.*, 1977, 199, 231—262.
26. *Colquhoun D., Henderson R., Ritchie J. M.* The binding of labelled tetrodotoxin to non — myelinated nerve fibre. — *J. Physiol.*, 1972, 227, 95—126.
27. *Colquhoun D., Large W. A., Rang H. P.* An analysis of the action of a false transmitter at the neuromuscular junction. — *J. Physiol.*, 1977, 266, 361—395.
28. *Creese R., Maclagan M.* Labelled decamethonium in cat muscle. — *Br. J. Pharmacol.*, 1976, 58, 141—148.
29. *Creese R., Taylor D. B., Tilton B.* The influence of curare on the uptake and



- release of a neuromuscular blocking agent with radioactive iodine. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1963, 139, 8—17.
30. *Dreyer F., Müller K. D., Peper K., Sterz R.* The M. omohyoideus of the mouse as a convenient mammalian muscle preparation. — *Pflüg. Arch.*, 1976, 367, 115—122.
  31. *Feltz A., Large W. A., Trautmann A.* Analysis of atropine action at the frog neuromuscular junction. — *J. Physiol.*, 1977, 269, 109—130.
  32. *Gage P. W.* Generation of end-plate potentials. — *Physiol. Rev.*, 1976, 56, 177—247.
  33. *Gage P. W., McBurney R. N., Van Helden D. V.* Octanol reduces end plate channel lifetime. — *J. Physiol.* (in press), 1978.
  34. *Henderson R., Ritchie J. M., Strichartz G. R.* The binding of labelled saxitoxin to the sodium channels in nerve membranes. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 235, 783—804.
  35. *Hille B.* The pH-dependent rate of action of local anesthetics on the Node of Ranvier. — *J. Gen. Physiol.*, 1977, 69, 475—496.
  36. *Hille B.* Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor interaction. — *J. Gen. Physiol.*, 1977, 69, 497—515.
  37. *Katz B., Miledi R.* Membrane noise produced by acetylcholine. — *Nature*, 1970, 226, 962—963.
  38. *Katz B., Miledi R.* The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. — *J. Physiol.*, 1972, 224, 665—699.
  39. *Katz B., Miledi R.* The effect of procaine on the action of acetylcholine at the neuromuscular junction. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 249, 269—284.
  40. *Large W. A., Rang H. P.* A false transmitter at the neuromuscular junction. — *J. Physiol.*, 1976, 258, 105—106P.
  41. *Lass Y., Fischbach G. D.* A discontinuous relationship between the acetylcholine-activated channel conductance and temperature. — *Nature*, 1976, 263, 150—151.
  42. *Lester H. A., Chang H. W.* Response of acetylcholine receptors to rapid photochemically produced increases in agonist concentration. — *Nature*, 1977, 266, 373—374.
  43. *Marty A.* Noise and relaxation studies of ACh induced currents in the presence of procaine. — *J. Physiol.* (in press), 1978.
  44. *Mrose H. E., Ritchie J. M.* Local anaesthetics: Do benzocaine and lidocaine act at the same site? — *J. Gen. Physiol.*, 1978 (in press).
  45. *Neher E., Sakmann B.* Voltage dependence of drug induced conductance in frog neuromuscular junction. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 2140—2144.
  46. *Neher E., Steinbach J. H.* Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. — *J. Physiol.*, 1978 (in press).
  47. *Neher E., Stevens C. F.* Conductance fluctuations and ionic pores in membranes. — *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1977, 6, 345—381.
  48. *Ritchie J. M.* Mechanism of action of local anaesthetic agents and biotoxins. — *Br. J. Anaesthesiol.*, 1975, 47, 191—198.
  49. *Ritchie J. M., Ritchie B. R.* Local anaesthetics: Effect of pH on activity. — *Science*, 1968, 162, 1394—1395.
  50. *Ruff R. L.* A quantitative analysis of local anesthetic alteration on miniature end-plate currents and end-plate fluctuations. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 264, 89—124.
  51. *Shrivastav B. B., Narahashi T., Kitz R. J., Roberts J. D.* Mode of action of trichloroethylene on squid axon membranes. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, 199, 179—188.
  52. *Steinbach A. B.* Alteration by xylocaine (lidocaine) and its derivatives of the time course of the end-plate potential. — *J. Gen. Physiol.*, 1968, 52, 144—161.
  53. *Steinbach A. B.* A kinetic model for the action of xylocaine on the receptors for acetylcholine. — *J. Gen. Physiol.*, 1968, 52, 162—180.

54. *Stephenson R. P.* A modification of receptor theory. — *Br. J. Pharmacol.*, 1956, 11, 379—393.
55. *Stevens C. F.* Inferences about membrane properties from electrical noise measurements. — *Biophys. J.*, 1972, 12, 1028—1047.
56. *Strichartz G. R.* The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. — *J. Gen. Physiol.*, 1973, 62, 37—57.
57. *Taylor D. B., Nedergaard A.* Relation between structure and action of quaternary ammonium neuromuscular blocking agents. — *Physiol. Rev.*, 1965, 45, 523—554.
58. *Ulbricht W., Wagner H. H.* Block of potassium channels of the nodal membranes by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. — *Pflüg. Arch.*, 1976, 367, 77—87.
59. *Wagner H. H., Ulbricht W.* Saxitoxin and procaine act independently on separate sites of the sodium channel. — *Pflüg. Arch.*, 1976, 364, 65—70.
60. *Woodhull A. M.* Ionic blockage of sodium channels in nerve. — *J. Gen. Physiol.*, 1973, 61, 687—708.

# РЕЦЕПТОРЫ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ

## УЛЬТРАСТРУКТУРА АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СОЕДИНЕНИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ДЖОН И. РАШ, К. СЬЮ ХАДСАН, МАРК Х. ЭЛЛИСМАН  
(JOHN E. RASH\*, C. SUE HUDSON\*, MARK H. ELLISMAN\*\*)

\* Отдел фармакологии и экспериментальной терапии, Университет штата Мэриленд, Медицинская школа, Балтимор, Мэриленд 21201

\*\* Отдел неврологии, Медицинская школа, Калифорнийский университет, Сан-Диего, Ла Холла, Калифорния 92093, США

### ВВЕДЕНИЕ

Исторически сложилось так, что сейчас никотиновый рецептор ацетилхолина (АХ) в нервно-мышечном соединении и электрических органах позвоночных является наиболее тщательно изученным из всех рецепторов лекарств. Этот рецептор был выделен, очищен до гомогенного состояния, охарактеризован биохимически, фармакологически и иммунологически; более того, многие из его электрофизиологических и морфологических свойств изучены *in vivo* и *in vitro* [12, 20, 37, 43, 44]. Помимо этого, информация, полученная в процессе его изучения, и экспериментальные приемы, разработанные в процессе исследования никотиновых рецепторов АХ у позвоночных, были в модифицированном виде использованы и при изучении многих других рецепторов.

Таким образом, представляется целесообразным хотя бы бегло рассмотреть методы, использованные при изучении никотинового рецептора.

Фармакологические и физиологические исследования в области взаимодействий лекарств с рецепторами были начаты на рубеже XX века Langley [36], который продемонстрировал наличие судорожных и тонических мышечных сокращений после местного действия никотина и ацетилхолина на нервно-мышечное соединение млекопитающих с помощью тонкой кисточки из соболиного меха. Первоначальное предположение Langley, что сокращение вызвано «рецептирующими веществами», локализованными на концевой пластинке, было в дальнейшем уточнено Dale, Feldberg и Vogt [15], которые постулировали, что передача нервного импульса опосредована взаимодействием выделяемого нервом АХ со специфическими никотиновыми рецепторными центрами для АХ. В дальнейшем детальные эксперименты Kuffler [35], Fatt и Katz [27], del Castillo и Katz [16], Hodgkin и Huxley [32] привели к формированию концепции тонкой регуляции ионных проницаемостей, включающей электро- и хемочувствительные ионные каналы, например каналы для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , и никотиновые рецепторы АХ. Для морфологов рецептор АХ превратился в объект интенсивных исследований, за которыми последовали качественные автордио-

графические эксперименты Waser и Lüthi [58], а также Waser [57], которые использовали радиоактивный кураре и декаметоний для определения числа рецепторов АХ в двигательных концевых пластинках млекопитающих. Тем не менее исключительно важное открытие  $\alpha$ -бунгаротоксина (БТ) Chang и Lee [11] дало возможность использовать его как молекулярную пробу для проведения детального фармакологического и ультраструктурного анализа никотиновых рецепторов АХ. Было показано, что  $\alpha$ -БТ, представляющий собой основной полипептидный компонент яда формозского ленточного крайта, Bungarus multicinctus является высокоспецифическим и практически необратимым лигандом никотинового рецептора АХ [13]. Таким образом, современные ультраструктурные исследования передачи нервного импульса могут использовать методологии различных областей биохимии, фармакологии, электрофизиологии, иммунологии и электронной микроскопии в своих попытках установить морфологическую основу химической возбудимости и электрогенеза. Эти комбинированные подходы в настоящее время используются даже при изучении индивидуальных трансмембранных макромолекул.

В течение последних 5 лет ученые более чем десятка лабораторий независимо и почти одновременно использовали метод замораживания-скалывания или другие общепринятые методы электронной микроскопии для выделения и определения количества рецепторных комплексов АХ из разнообразных источников как *in vivo*, так и *in vitro* [2, 9, 17, 20, 28, 29, 31, 38, 40—42, 48—50]. Кроме того, была описана макромолекулярная архитектура постсинаптических мембран нормальной двигательной концевой пластинки млекопитающих и проведено ее сравнение со свойствами денервированных, дистрофических и миастенических концевых пластинок [4, 21, 22, 46, 48—52]. Эти исследования были направлены на выяснение деталей внутренней морфологии названных мембран и, в частности, на выяснение точного распределения внутримембранных образований, представляющих собой *in vivo* функциональные рецепторные комплексы АХ. Используемые методы ультраструктурных исследований позволили выявить неожиданные детали, касающиеся размера, примерной молекулярной массы и вероятного числа структурных субъединиц в комплексе никотинового рецептора АХ и модулятора ионной проводимости млекопитающих [1]. В более поздних исследованиях установлено наличие положительной корреляции между структурой и функцией рецептора на молекулярном уровне, что оказалось возможным благодаря применению точного иммунологического мечения специфических трансмембранных макромолекул в изолированных везикулах из *Torpedo electropлах* [47], у животных с экспериментальной аутоиммунной миастенией [14, 33] и с меньшей определенностью у людей с острой миастенией [33, 23].

Целью настоящего раздела является последовательное изложение имеющейся информации относительно морфологии рецепторов АХ млекопитающих в условиях *in vivo* и, по возможности, срав-

цельные морфологии и распределения рецепторов АХ первично-мышечного соединения млекопитающих с аналогичными данными относительно двигательных концевых пластинок в различных классах позвоночных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах, которые будут описаны ниже, использовали тканевые мембранные препараты, полученные из крыс, мышей, кроликов, человека и электрического ската, *Torpedo ocellata*. Все образцы фиксировали в 2,5% глутаральдегиде. Детали методов описаны Rash и Ellisman [48], Ellisman и др. [22], Albuquerque и др. [4], Ellisman и Rash [21], Rash и др. [47], Eldetrawi и др. [20], Eldetrawi и др. [19]. Контрастирование с помощью четырехокиси осмия и ферроцианида калия для выявления основных мембранных белков проводили действием на образцы 1% раствора  $\text{OsO}_4$  и 0,003 моль/л  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  в растворе Рингера для крыс немедленно вслед за фиксацией образцов глутаральдегидом или после экстракции липидов метанолом и ацетоном [48]. «Сэндвич»-метод идентификации рецептора с помощью конъюгатов ферритина и антитела заключается в последовательном мечении рецепторов АХ антисывороткой или осажденным сульфатом аммония с очищенным на сефадексе G-200 иммуноглобулином против рецептора АХ (первичные IgG), полученными из экспериментальных аутоиммунных кроликов с миастенией, и взаимодействии обработанных тканей с мечеными ферритином козьими иммуноглобулинами против первичной метки (кроличьи IgG).

Тонкие срезы и реплики изучали при 80 или 100 кВ на электронном микроскопе Siemens Elmiskop 101, оборудованном гониометром с углом отклонения  $\pm 24^\circ$ , или на электронном микроскопе JEM 100B, оборудованном гониометром с углом отклонения  $\pm 30^\circ$ . Толстые срезы изучали при 1000 кВ на высоковольтном электронном микроскопе JEM-1000. Для лучшего различения деталей макромолекулярной субструктуры представлены стереомикрофотографии. Отклонение параллакса для структур размером 10 нм составляет 0,5—1 нм при угле наклона  $10\text{--}20^\circ$ , что требует применения электронного микроскопа с разрешением 0,3—0,5 нм. Помимо этого, случайные эффекты фокусирования фазового контраста, которые могли бы быть ошибочно интерпретированы как детали молекулярного строения, не обязательно появляются на плане реплики, а иногда наблюдаются в виде трехмерного помутнения или облака выше и ниже реплики, что заметно уменьшает вероятность истолкования артефактов фокусирования как молекулярных деталей. Несмотря на улучшенное разрешение, достигаемое при стереоизображении, точное описание структурных деталей крупных макромолекулярных комплексов, таких, как рецептор АХ млекопитающих, должно быть дополнено данными негативного контрастирования и (или) кругового оттенения.

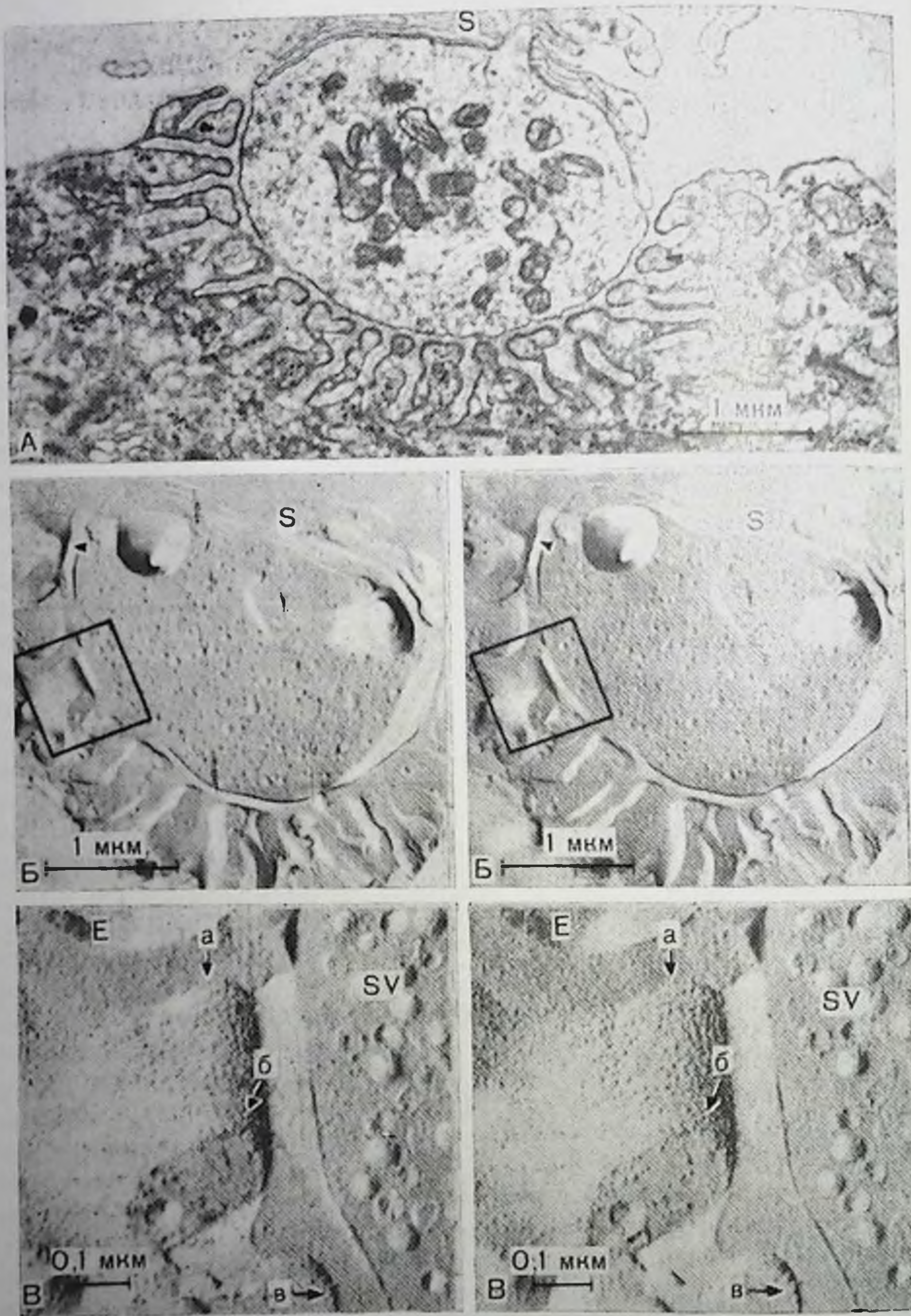


Рис. 13. А — поперечный срез части однопочного нервного окончания разгибающей мышцы *digitorum longus* крысы. Плоское образование — «кэп» (S), состоящее из клеток Шванна покрывает отросток нерва. Многочисленные соединительные складки обладают несколько утолщенными мембранами в гребнях, обогащенных рецепторами ацетилхолина; ув. 18 000; Б — стереоскопическое изображение поперечного скола двигательной концевой пластинки той же мышцы. В первом окончании видны синаптические везикулы, тогда как на гребнях соединительных складок обнаруживаются неравномерные ряды частиц (показаны стрелками); ув. 18 000. В — стереоизображение греб-

## НАБЛЮДЕНИЯ

### Первно-мышечное соединение млекопитающих на тонких срезах и репликах, полученных методом замораживания-скальвания

Как было показано с использованием радиоактивного БХ, рецепторы АХ нормального первно-мышечного соединения млекопитающих почти полностью принадлежат верхним 25% соединительных складок [2, 28, 29, 41], что хорошо соответствует распределению электронно-плотного материала в выступах соединительных складок (рис. 13, А), как это впервые описано Birks, Huxley и Katz [7]. Одновременно близкое распределение относительно гомогенного класса частиц размером около 10 нм (рис. 13, Б, В) было описано для реплик, полученных методом замораживания-скальвания, постсинаптических мембран первно-мышечного соединения млекопитающих [48—50] и амфибий [17, 31, 40]. Поскольку предполагалось, что комплексный функциональный рецептор АХ представляет собой трансмембранную макромолекулу, которая должна быть видна на репликах, полученных методом замораживания-скальвания, и частицы на гребне соединительной складки представляли собой единственный наблюдаемый объект, который мог быть соотнесен с рецепторной активностью, то частицы размером 10 нм на Р-границе [8] первоначально рассматривали как центры, связывающие АХ и(или) регулирующие ионную проницаемость.

В двигательных концевых пластинках полосатых мышц млекопитающих подобные частицы имели диаметр 10—13 или 11—14 нм [48, 49] и были организованы в виде неодинаковых параллельных елочкообразных рядов, перпендикулярных оси соединительной складки (рис. 14, А, Б, Г, Д). В случае их присутствия эти ряды нередко обнаруживают равномерную периодичность на расстоянии порядка 50 нм (рис. 14, А, Б). Однако по бокам и на дне складок дополнительно можно наблюдать беспорядочно рассеянные частицы диаметром от 8 до 14 нм, имеющие намного меньшую плотность популяции. Поскольку площадь, занятая этими частицами, неспособна связывать БТ, им приписали функции, отличные от рецепции АХ.

Каждый ряд частиц на гребне складки представляет собой наклонно ориентированные линейные образования, состоящие из трех (иногда из двух) частиц размером около 10 нм, причем на

←  
ия соединительной складки, показывающее предполагаемый комплекс рецептора ацетилхолина на трех Р-плоскостях: а — на поверхности раздела фаз между расщепленной мембраной и внеклеточным льдом, б — в экспонированной мембране Р-плоскости и в — на поверхности раздела фаз между расщепленной мембраной и цитоплазматическим льдом. Е-плоскости соединительных складок (Е) обнаруживают значительное число небольших углублений, но содержат относительно мало частиц: ув. 81 000.

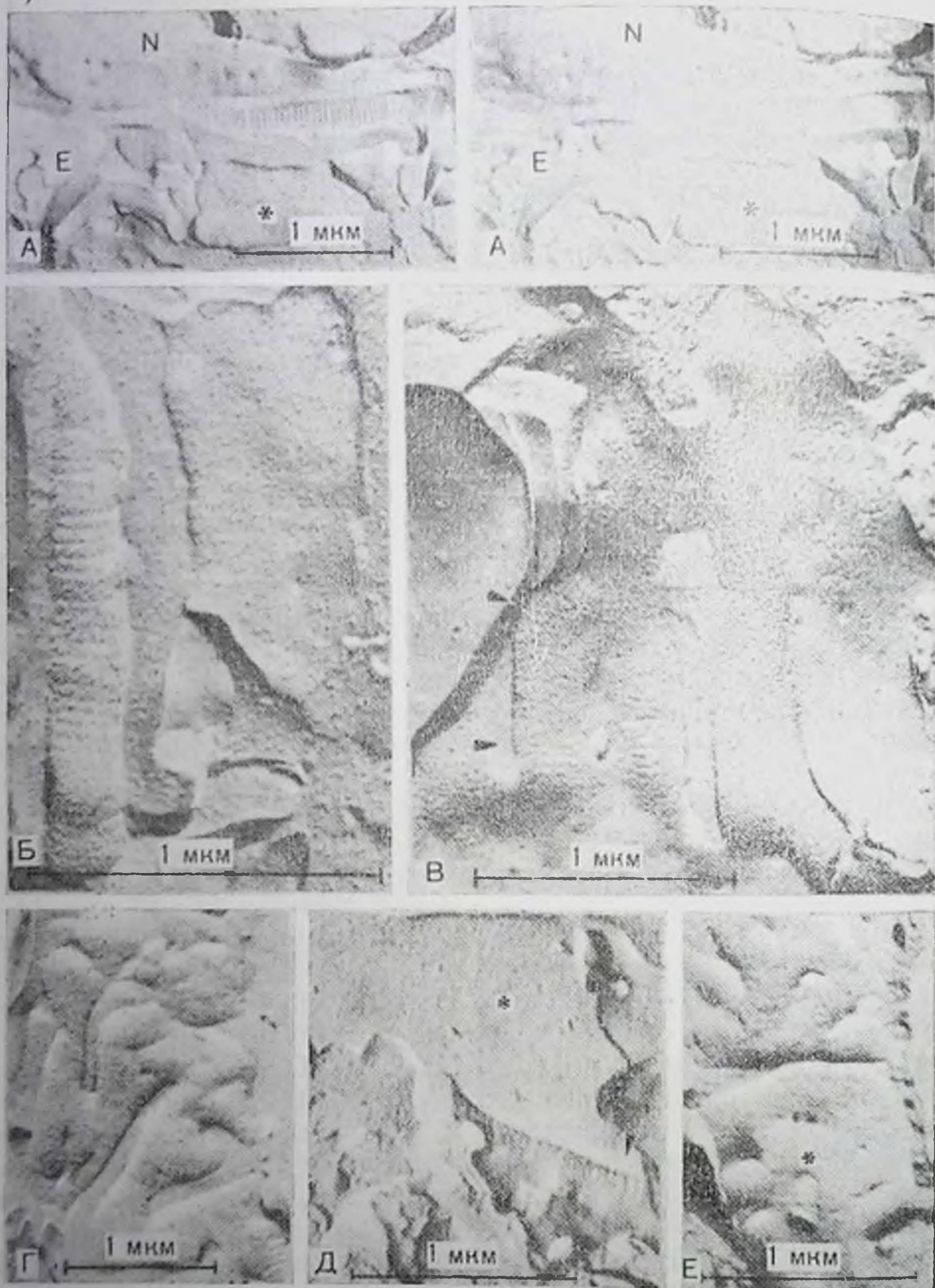


Рис. 14. А — стереоизображения Е-плоскости и Р-плоскости соединительных складок. Видны неравномерные ряды частиц размером 9—13 нм, расположенные на гребнях складок; отсутствует определенное расположение элементов по бокам складок (звездочка); на Е-плоскости нерва (N) можно обнаружить многочисленные слившиеся синаптические везикулы; ув. 21 200; Б — на гребнях складок видны ряды частиц, расположенные с периодичностью 50 нм. Отчетливое изображение этих частиц получается при использовании малого угла оттенения в направлении, перпендикулярном оси ряда; ув. 53 000; В — перво-мышечное соединение лягушки. Видны частицы размером 10 нм, расположенные на гребнях складок, а также показаны стрел-



расстоянии 1 мкм располагается до 200 частиц. Очень небольшое количество частиц наблюдается на Е-гребнях соединительных складок (рис. 14, А, Б, В). Таким образом, может быть рассчитана максимальная плотность упаковки частиц, которая составляет 4000 на 1 мкм<sup>2</sup>. На больших площадях с плотной упаковкой рядов частиц число их может достигать до 3750 на 1 мкм<sup>2</sup> (рис. 14, А, Б, Г), тогда как на более беспорядочно заселенных областях (в том числе на обоих гребнях и на боковых краях складок) плотность заселения падает до 2000 на 1 мкм<sup>2</sup> [48]. Таким образом, плотность упаковки частиц внутри концевой пластинки варьирует, но может быть в среднем оценена в 3000 на 1 мкм<sup>2</sup> для гребней складок. Это значение несколько меньше, чем определенное для концевых пластинок амфибий, где оно составляет 4000—6000 мкм<sup>2</sup> [31, 40]. Кроме того, сейчас уже можно сказать, что концевые пластинки амфибий также демонстрируют характерную «рядную» организацию постсинаптических частиц (рис. 14, В), но область квазикристаллической организации в этом случае обычно намного меньше, чем наблюдаемая в концевых пластинках млекопитающих. (Следует учесть, что наблюдаемая разница в организации частиц может быть следствием разных препаративных методов, поскольку препараты концевых пластинок амфибий получали методом быстрого замораживания и без предварительной фиксации или обработки глицерином.)

Принадлежность частиц размером 10 нм к богатым рецепторами гребням складок и их регулярное расположение в рядах требуют дальнейшего изучения. В толстых срезах, изученных на электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 1000 кВ, волокна размером 10 нм эпизодически удавалось наблюдать в корковой цитоплазме соединительных складок [22]. Эти волокна были перпендикулярны оси складки (рис. 15, А) и обнаруживали слаборазличимые поперечные мостики (отмеченные на рисунке стрелками), соединяющие их с участками, занятыми рецепторами АХ и частицами, обнаруженными методом замораживания-скалывания. Хотя прямой связи между волокнами и рядами частиц продемонстрировано не было, необходимо допустить наличие структурного единства, благодаря которому вдоль гребня складки частицы удерживаются в елочкообразных рядах. Эту функцию могут выполнять подкорковые волокна [22] (рис. 15, Б), хотя не следует

←

ками неравномерные ряды частиц; ув. 35 700 (Dr. John Heuser. Моторная иннервация мышц. — Лондон, 1976); Г — гребни нескольких соединительных складок двигательной концевой пластинки разгибающей мышцы *digitorum longus* нормальной крысы. Видны равномерно расположенные ряды частиц и относительно равномерная упаковка этих частиц; ув. 21 200; Д — гребень соединительной складки после 4 дней денервации. Показанные стрелкой ряды частиц изменяются мало, хотя первые окончания исчезают (звездочка); ув. 31 400; Е — гребни нескольких соединительных складок после 8 дней денервации. В некоторых местах видно разрушение рядов частиц (звездочки) и понижение на 20—30% плотности упаковки частиц; ув. 29 700.

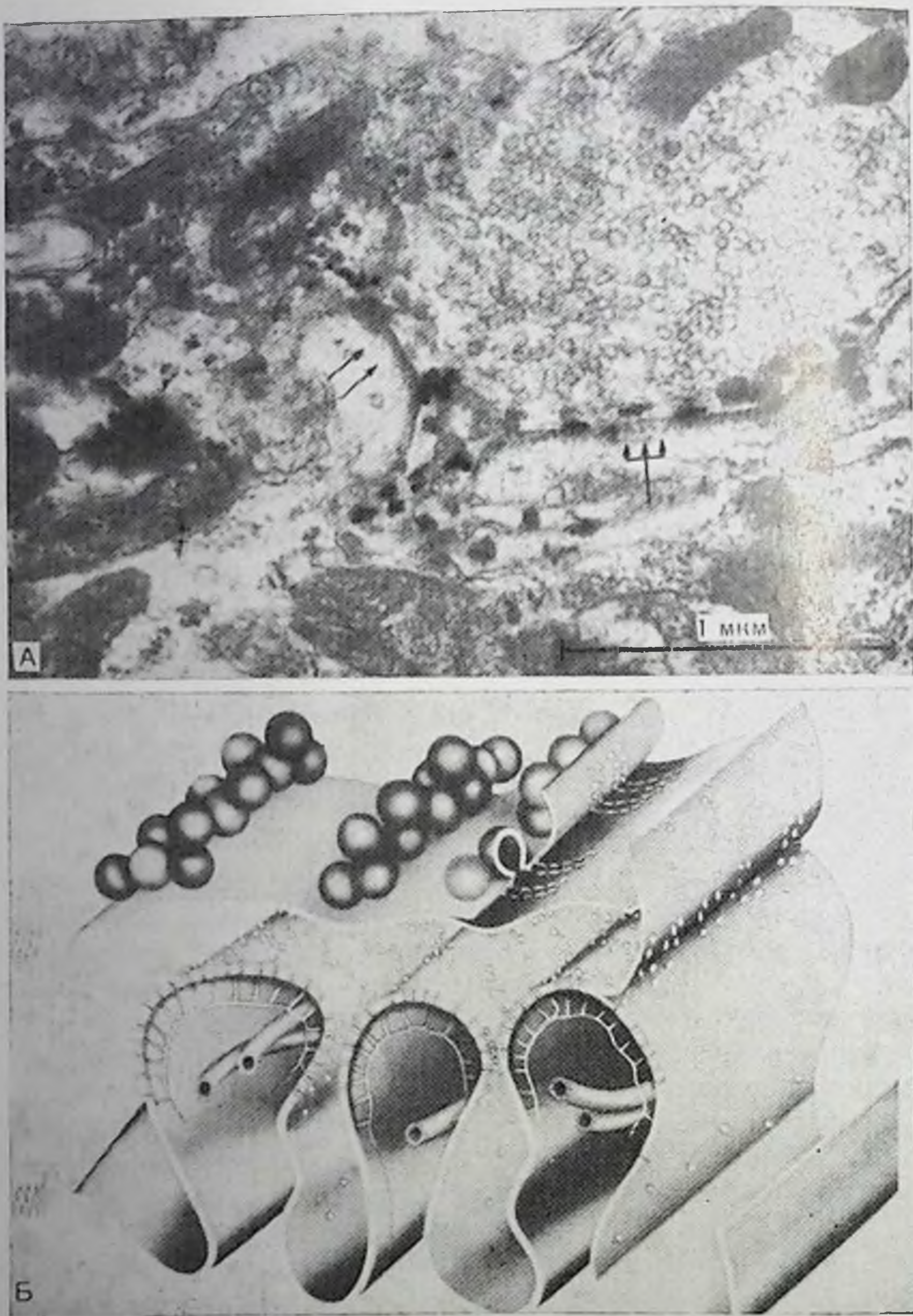


Рис. 15. А — срез размером 0,25 мк, сфотографированный при 1 000 000 В. В гребнях соединительных складок видны волокна диаметром 10 нм: иногда удается заметить мостики (отмечены стрелками), связывающие их с мембранами гребня, содержащими рецепторы ацетилхолина. Неравномерно расположенные темные пятна (отмечены трезубцем) могут представлять собой позитивно контрастированные рецепторные комплексы ацетилхолина; ув. 45 000 [22]; Б — схематическое изображение взаимосвязи между центрами высвобождения везикул, неравномерными рядами предполагаемых ацетилхолиновых рецепторов и сетью кортикальных волокон. Информация о факторах, вызывающих слипание частиц в ряды и обеспечивающих перпендикулярность расположения этих рядов в 50 нм, недостаточна. Печатается с разрешения «Journal of Cell Biology».

недооценивать и возможность того, что элементами, обеспечивающими организацию частиц и периодичность рядов, могут быть компоненты плотной корковой матрицы, а также обычно наблюдаемые микротрубочки (см. рис. 13, А). Дополнительно следует заметить, что на тангенциальных срезах гребней складок нередко можно наблюдать неравномерные ряды очень плотного материала, возможно, представляющего собой дополнительные структурные элементы или даже видимый на тонких срезах эквивалент частиц, обнаруживающихся при использовании метода замораживания-скалывания. Для улучшения выделения структур на этих участках разработана специальная техника контрастирования, позволяющая качественно выделить рецепторы АХ и другие интегральные мембранные белки (см. ниже).

### Эффекты, вызываемые денервацией

Было обнаружено, что в результате длительной денервации волокна мышц млекопитающих по всей поверхности приобретают чувствительность к АХ [3]; это явление называют «денервационной гиперчувствительностью». На концевых пластинках, однако, в течение этого времени должно, вероятно, наблюдаться некоторое уменьшение числа рецепторов АХ [5, 6], хотя Chang и соавт. [10] сообщают о непонятном повышении плотности рецепторов концевой пластинки на 220% после денервации. Несмотря на большие изменения в высоте и морфологии соединительных складок, наблюдаемые после 4 дней денервации, характерная картина организации частиц в ряды сохраняется на гребнях многих складок (см. рис. 14, Д, отмечено стрелками). После 8 дней денервации (см. рис. 14, Е) на репликах, полученных методом замораживания-скалывания, видны лишь незначительные изменения в плотности рецепторов на концевой пластинке, причем из рядов исчезает или перемещается 20—30% частиц [21]. Сравните нормальную концевую пластинку (см. рис. 14, Г) с аналогичным участком концевой пластинки, денервация которой продолжалась в течение 8 дней (см. рис. 14, Е). Результаты подобных денервационных экспериментов указывают на существование механизмов поддержания стабильности молекулярной структуры против действия диффузионных сил в жидкой мышечной мембране [54].

### Субструктура рецепторов АХ

Количественные электронно-микроскопические автордиографические исследования Fertuck и Salpeter [28, 29], Porter и Barnard [41] позволили установить, что в гребнях соединительных складок концевых пластинок млекопитающих плотность связывающих центров для БТ составляет 31 000 ( $\pm 27\%$ ) или 20 000—25 000 центров на 1  $\mu\text{m}^2$ . В противоположность этому количество частиц составляет только около 3000 на 1  $\mu\text{m}^2$  (2000—4000 на 1  $\mu\text{m}^2$ ). Таким образом, был сделан вывод, что если эти частицы

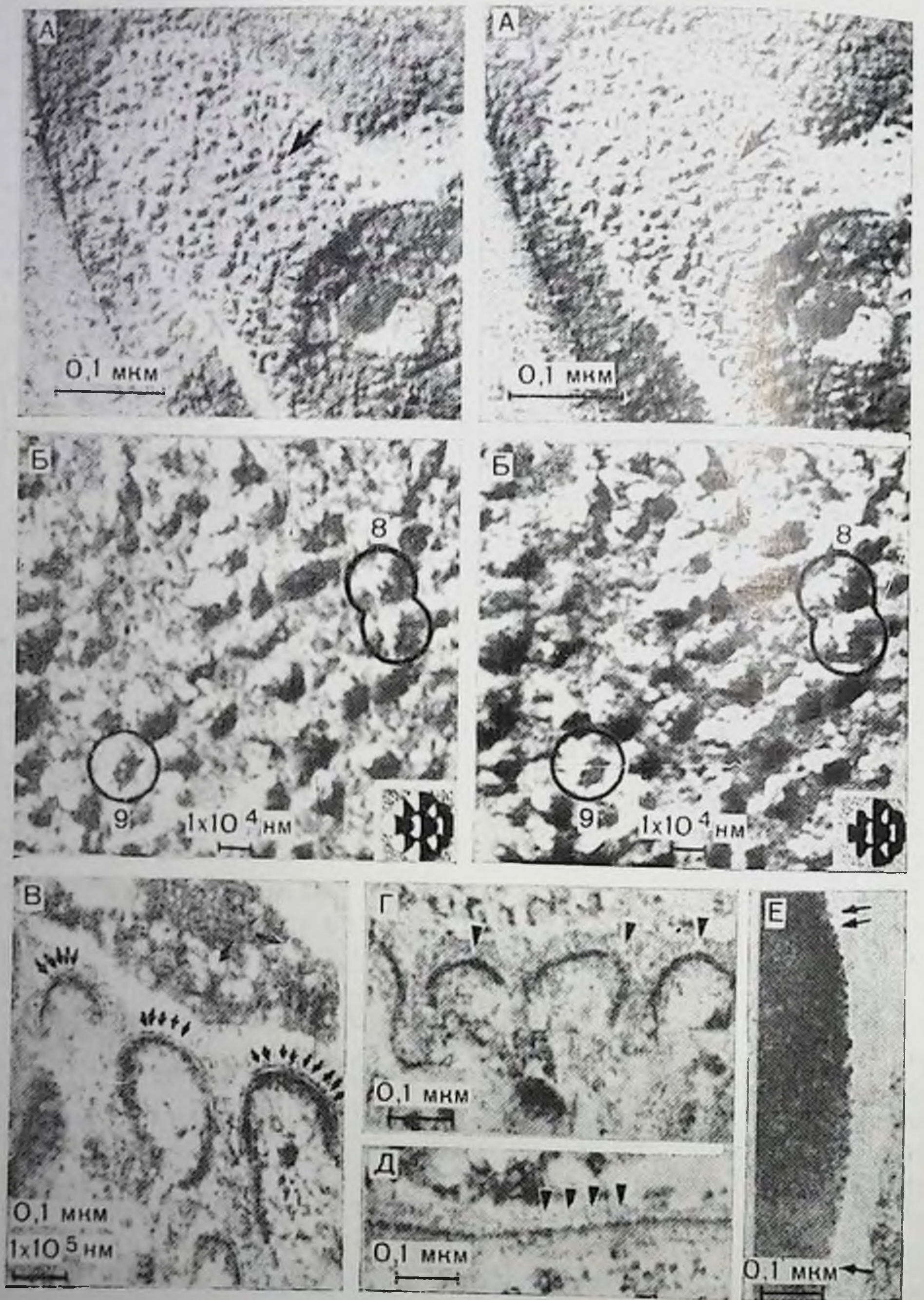


Рис. 16. А — полученные методом обратного контрастирования стереоизображения Р-плоскости гребня соединительной складки. Структуры, покрытые платиной, представляются белыми, тогда как непокрытые структуры обна- руживаются в виде темных теней [55]. При малых средних увеличениях изо- бражения, полученные таким способом, мало отличаются от обычных, одна- ко при больших увеличениях интерпретация деталей облегчена; ув. 153 000: Б — полученные методом обратного контрастирования при очень большом увеличении стереоизображения отмеченной стрелкой центральной части рис. 16, А. Удастся достичь разрешения подструктур типа (8+1) для пе-

соответствуют функциональным рецепторам АХ (или связаны с ними), то каждый из них должен содержать 5—10 пептидов связывания БТ. Изучение частиц при больших степенях увеличения и лучшем разрешении поможет разрешить кажущееся несоответствие.

Изображения, полученные методом замораживания-скальвания, обычно печатают таким образом, что наряду с темными участками, соответствующими местам напыления платины, над реальными структурными элементами возникают белые участки (см. рис. 14, Б). Эти светлые участки, являющиеся артефактами, легко могут быть приняты за структурные элементы, особенно начинающим исследователем, не слишком хорошо знакомым с интерпретацией реплик, полученных методом замораживания-скальвания. Однако, как предложено Steere [55] в первом описании метода замораживания-скальвания, интерпретация молекулярных деталей значительно облегчается, если наблюдаемое изображение содержит темные тени. Недавние измерения, выполненные с помощью оригинальных фотопластинок с обращенным контрастом (фотографические позитивы, по определению Steere) и с помощью позитивных отпечатков высокого разрешения третьего поколения (рис. 16, А), показывают, что рецепторные комплексы представляют собой круглые или овальные образования размером 9—12 нм

←

скольких частиц размером 9—13 нм. Следует заметить, что пластическая деформация частиц в процессе скальвания, незначительные вариации толщины реплики и рекристаллизация платины в процессе исходной репликации или облучения электронами могут привести к появлению ложных субъединичных структур или, наоборот, снизить структурные детали в других частицах. Несмотря на все оговорки, касающиеся процессов оттенения, скальвания и получения изображения, обнаружение на снимках структурных образований типа (8+1) и (9+1) согласуется с данными, полученными другими методами; ув. 459 000; построенное в соответствии с имеющимися данными реконструированное изображение «типичной» реплики, полученной методом замораживания-скальвания, индивидуального рецепторного комплекса размером 10 нм с эквивалентным увеличением в 900 000 раз приведено на врезке к рис. 16, Б; В — изображения зафиксированных глутаровым альдегидом, подвергнутых экстракции липидов и контрастированных осмием гребней соединительных складок обнаруживают внеплазматическое распределение периодических плотностей. Даже без дополнительной информации полученные изображения указывают на то, что предполагаемые рецепторные комплексы ацетилхолина представляют собой внешние неинтегральные белки (указаны стрелками); ув. 81 000; Г, Д — поперечные и продольные срезы фиксированных глутаровым альдегидом, подвергнутых экстракции липидов и контрастированных  $\text{OsO}_4 + \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  гребней соединительных складок, на которых обнаруживаются образования, представляющие собой характерный для тонких срезов эквивалент рядов частиц (указаны стрелками). Обнаруживаемая периодичность этих образований порядка 50 нм (рис. 16, Д) соответствует наблюдаемой на изображениях, полученных методом замораживания-скальвания (см. рис. 14, Б). Все изображения тщательно проанализированы с помощью гониометра; ув. 90 000; Е — плазматическая мембрана эритроцита из образца, показанного на рис. 16, Г, на которой при сильном контрастировании можно заметить редко расположенные трансмембранные белки (указаны стрелками), что доказывает применимость использованных методов контрастирования; ув. 86 400.

и средним диаметром порядка 10 нм. Это проверенное значение несколько ниже установленного ранее [48, 49], но близко определенному для случая рецепторов в соединении амфибий [31]. Следует отметить, однако, что это значение на 20—30% выше определенного для рецепторов пластинки электрического органа у *Torpedo* или *Electrophorus*, которые содержат 5 или 6 структурных единиц [9, 20, 38].

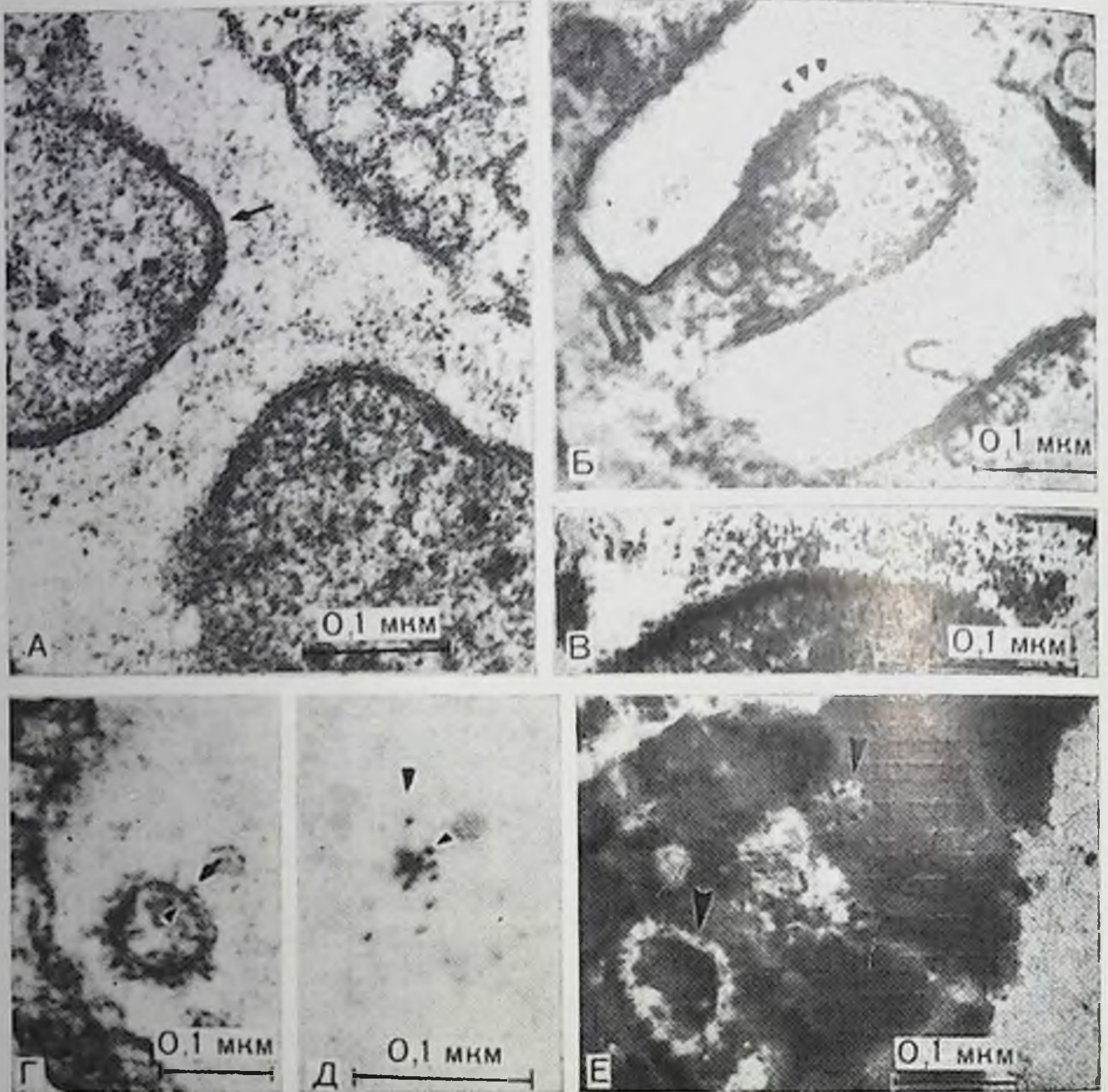
При изучении соединительных складок на стереоизображениях с очень большим увеличением по методу Steege (рис. 16, Б) удастся заметить, что частицы размером 10 нм (отмечены стрелками) состоят из центральной субъединицы (или агрегата) размером 3,5—4,5 нм и порядка 8 (8, 9 или даже 10) периферических субъединиц размером около 3 нм. (Следует понимать, что структурная субъединица может состоять из одного или нескольких индивидуальных биохимических компонентов.) Поскольку слой пластины относительно толще на напыленной стороне молекулы, чем на ненапыленной, ограничения фотографического изображения не позволяют достичь хорошего разрешения обеих сторон на одном изображении. Поэтому для разъяснения приведенного истолкования микрофотографий на рис. 15, Б дана трехмерная схема строения подобного 8 : 1 комплекса, которая сконструирована на основе многих стереоизображений. Молекулярные размеры этого комплекса, определенные из стереоизображений, вертикальных, наклонных и горизонтальных проекций складок, а также по частицам на краях сколов (где их цитоплазматические и внеклеточные размеры не так сильно искажаются в процессе скалывания: см. рис. 13, В), позволяют считать, что такие частицы представляют собой цилиндр или усеченный конус диаметром около 10 нм. По-видимому, они также на 3—4 нм погружены в кортикальную цитоплазму, выступая примерно на 8 нм над скалываемой и фиксируемой на реплике стороной мембраны, пронизывают питактную мембрану и еще на 2—4 нм вдаются в синаптическую щель. На основании приведенных измерений и исходя из предположения, что эти частицы представляют собой белок, можно определить приблизительную молекулярную массу как всего комплекса, так и каждой из его субъединиц.

Поскольку глобулярный белок (плотностью 1,3 г/мл) имеет плотность ( $d$ ), соответствующую 810 дальтон/нм<sup>3</sup> (1 дальтон =  $= 1,6 \cdot 10^{-24}$  г), то комплекс размером 10 нм будет иметь молекулярную массу  $W = VD$  (объем · плотность) =  $\pi r^2 h d = 890\,000$ . По той же формуле рассчитано, что каждая периферическая субъединица имеет молекулярную массу 80 000 дальтон, а центральная субъединица (если это действительно белок) около 145 000. Если суммировать молекулярные массы всех компонентов 8 : 1 комплекса, то общая масса агрегата составит 780 000. Каждое из двух приведенных значений в 2—3 раза превышает молекулярную массу очищенного рецептора AX из электрических органов в присутствии тритона X-100 (270 000—330 000 дальтон) и в 8—10 раз — ранее определенную молекулярную массу очищенного мономера

(иными словами, субъединицы или субъединиц, несущих на себе центр связывания АХ [18]). Однако, поскольку общее число частиц составляло лишь около  $1/10$  числа связывающих центров БТ, но каждая из частиц имела массу, примерно в 10 раз большую, чем мономер рецептора, был сделан вывод, что частицы размером 10 нм содержат достаточно материала, чтобы быть идентифицированными как зарегистрированные методом авторадиографии рецепторы АХ. (Иммунологические и гистохимические доказательства того, что эти частицы содержат рецепторные белки АХ, приведены ниже.)

### Выделение основных мембранных белков

Безлипидные, преимущественно гидрофильные (осмофильные), части белков могут быть выделены на изображениях, если соединительные складки зафиксировать глутаральдегидом, экстрагировать растворителями для липидов (ацетон и метанол) и затем окрасить соответствующим способом (действием четырехоксида осмия, уранилацетата или цитрата свинца). На микрофотографиях гребней соединительных складок на наружных поверхностях мембран удастся наблюдать периодически расположенные уплотнения (рис. 16, В), хотя зарегистрировать образования, пронизывающие биолою, и не удастся. Вывод, что рецепторные белки располагаются на внешней стороне мембраны, не требует дополнительных доказательств. Поскольку частицы размером 10 нм в зафиксированных глутаральдегидом и обработанных методом замораживания-скалывания препаратах связаны с внутренней стороной мембраны, следует предположить, что два указанных типа структурных образований не эквивалентны. Однако полагают, что хотя бы часть функционального рецептора АХ — комплекс модуляции ионной проводимости [1] представляет собой постоянный трансмембранный ионный канал, значительная часть которого построена из гидрофобных (т. е. неосмофильных) аминокислотных остатков. И действительно, когда аналогичным образом зафиксированные глутаральдегидом и подвергнутые экстракции липидов концевые пластинки были окрашены смесью четырехоксида осмия и феррицианида калия (такая смесь по неизвестным причинам резко повышает окрашиваемость гидрофобных белков и проявляет с хорошим контрастом основные мембранные белки), обнаружено [45], что в серых или серо-черных срезах, подвергнутых тщательному гониометрическому анализу, в гребнях соединительных складок имеются периодически расположенные, но перекрывающиеся плотности, пронизывающие мембранный биолою (рис. 16, Г, Д) и на 2—4 нм входящие в синантическую щель. Эти трансмембранные, безлипидные и сшитые глутаральдегидом предположительно белковые макромолекулы, имеющие диаметр 8—10 нм, присутствуют в виде групп с периодичностью 50 нм и погружены в электронно-плотную оболочку; кроме того, иногда они ассоциированы с филаментами толщиной 10 нм. (Дополнительным подтвер-



Ж



Рис. 17. А — гребни соединительных складок и часть нервного окончания здорового человека. Незначительные, 2—3 нм, пертурбации экстраплазматических листочков (показаны стрелкой) могут представлять собой окрашиваемые осмием внеклеточные проекции рецепторного комплекса ацетилхолина; ув. 170 000; Б, В — сокращенная (в ракурсе) и нормальная соединительные складки у больного с острой миастенией. Богатые рецепторами гребни складок (указаны стрелками) равномерно покрыты палочками размером  $3 \times 7$  нм, по-видимому, прикрепленными к концевой части рецепторов ацетилхолина; ув.: Б — 14 025, В — 170 000; Г, Д — осколки везикул, остающиеся в синаптической щели, после разрушения соединительных складок у больного с хронической миастенией. I-, X- и Y-образные частицы, присоединенные к интегральным мембранным белкам (рис. 17, Г), представляют собой специфические человеческие антитела, что показано последующей инкубацией ткани



ждением широкой применимости смешанного окрашивания четырехокисью осмия и ферроцианидом калия служит приведенное на рис. 16, Е изображение части эритроцита, на котором ясно обнаруживаются разбросанные частицы диаметром 8—14 нм, принадлежащие плазматической мембране эритроцита, из которой экстрагированы липиды.) Хотя все эти изображения, по-видимому, представляют собой получаемый методом тонких срезов эквивалент макромолекулярных комплексов, обнаруживающихся на изображениях, полученных методом замораживания-скальвания, для подтверждения этого предположения необходимо дополнительные клинические и иммунологические исследования рецепторов АХ.

### Рецепторы АХ у пациентов с миастенией

В двигательных концевых пластинках пациентов с миастенией обнаруживаются выраженная дегенерация постсинаптических складок [24, 25] и понижение числа функциональных рецепторов АХ на 79—90% [4, 26, 46]. Кроме того, разрушение соединительных складок, по-видимому, опосредовано антителоподобными структурами, направленными против рецепторов АХ [23, 46], что напоминает явление, обнаруженное у лабораторных животных с экспериментальной аутоиммунной миастенией, индуцированной введением очищенных рецепторов АХ [39, 53].

В нормальных человеческих концевых пластинках, препараты которых получены общепринятыми методами, в соединительных складках обнаруживаются пертурбации в пределах 2—4 нм, которые, по-видимому, связаны с наличием выступающих осмиофильных концов рецепторов АХ (рис. 17, А). В аналогично приготовленных препаратах концевых пластинок пациентов недавно приобретенной миастенией обнаруживается, однако, что интактные соединительные складки равномерно покрыты необычным слоем «пушистого вещества» [46], который при больших увеличениях (рис. 17, Б, В) выглядит как слой связанных с поверхностью складки частиц размером 3—7 нм. При разрушении гребней со-



с конъюгированными с ферритином антителами козла против человека, представляющими собой смесь 70% анти-IgG, 25% анти-IgM и 5% анти-IgA; ув.: Г — 136 000, Д — 212 500 раз. Е — аналогичные осколки везикул (указаны стрелками), представляющие собой остатки соединительных складок у кролика с миастенией. Негативно контрастированы *in situ* (см. текст). Высокий титр антирецепторных антител (IgG) коррелирует с появлением пушистого покрытия, идентифицированного как кроличьи IgG (по методу, аналогичному использованному в случае рис. 17, Д). Следует отметить, что негативный контраст не проникает в интактные клетки (правое поле), но проникает в негерметичные везикулы; ув. 136 000. Ж — Схематическое изображение присоединения антирецепторного антитела к гипотетическому комплексу типа (8+1) ацетилхолинового рецептора. Ограниченное разрешение не позволяет определить точные места присоединения антитела (периферическая и (или) центральная субъединица). Эквивалентно ув. 1 275 000.

длинных складок рецепторов АХ на месте гребней видны везикулярные осколки мембран, также равномерно покрытые частицами размером 3—7 нм (рис. 17, Г). После смешанного окрашивания четырехокисью осмия и ферроцианидом калия места присоединения таких частиц (указаны стрелками) выделяются в виде предположительно белковых трансмембранных макромолекул, размеры которых совпадают с размерами рецепторных комплексов АХ. В поддержку предположения, высказанного ранее [4, 46], что эти присоединенные частицы близко напоминают позитивно и негативно окрашенные антитела, связанные с рецептором АХ [30, 56], показано, что концевые пластинки у пациентов с миастенией взаимодействуют с конъюгированными с ферритином антителами козла против человека (IgG, IgM, IgA). Сильное меченое везикулярных осколков (рис. 17, Д) демонстрирует, что «пушистое покрытие» содержит одно или несколько антител человека, предположительно — антител против рецепторов [33, 51]. Кроме того, Engel и соавт. [23] использовали конъюгированные с пероксидазой IgG и антикомплемента C<sub>3</sub> для демонстрации высокого титра этих иммуноглобулинов в синаптической щели. Хотя, как отмечают эти авторы, с помощью использованного метода нельзя выявить точную локализацию иммуноглобулинов (возникающие в результате диффузии артефакты приводят к неадекватному мечению близко расположенных пресинаптических мембран и мембран шванновских клеток, тем не менее полученные результаты подтверждают предположение, что миастения является аутоиммунным заболеванием, направленным против одного или нескольких компонентов периферического никотинового рецептора АХ. Тем не менее, поскольку биопсийный материал человека часто находится в неоптимальном состоянии для проведения ультраструктурных исследований и, помимо этого, был подвергнут воздействию многих лекарств и открыт для действия различных антител, дополнительный анализ проблемы был выполнен на двигательных концевых пластинках у кроликов с экспериментальной аутоиммунной миастенией, приводящей к образованию очень высоких титров специфических антител против рецептора АХ [39]. При анализе тканей этих животных на гребнях соединительных складок наблюдались такие же «пушистые покрытия»; они же сохранялись и на везикулярных осколках мембраны (см. рис. 17, Е). Эта концевая пластинка была негативно окрашена действием холинэстеразы по методу Koelle [34], после чего на нее осадил очень мелкодисперсную упомянутую выше осмиевоферроцианидную смесь. Эта процедура, безуспешная с точки зрения количественного окрашивания ацетилхолинэстеразы, привела к уникальному окрашиванию рассмотренных ранее интегральных мембранных белков. При последующем взаимодействии с конъюгированными с ферритином козьими антикроличьими IgG (или, в случае миастении человека, с козьими IgG против человека) было вновь подтверждено, что X- и Y-образные частицы представляют собой связанные антирецепторные антитела [33]. В результате описан-

ных экспериментов была предложена модель связывания антитела [46], включающая известные иммунологические и морфологические данные (рис. 17, Ж).

### Иммунологическая идентификация рецепторов АХ в тонких срезах и их взаимосвязь с частицами, обнаруживаемыми методом замораживания-скальвания

С целью идентификации рецепторов АХ и выяснения природы «пушистого покрытия», обнаруженного на материале, взятом у пациентов с миастенией и у животных с экспериментальной аутоиммунной миастенией, было проведено изучение «микромешочков» из *Torpedo ocellata* с помощью специальных иммунологических методов. Контрольные микромешочки (рис. 18, А), окрашенные незабуференным водным уранилацетатом, имеют относительно гладкие поверхности мембран с очень редкими и тусклыми матриксами базальных мембран (растворимые в кислотах полисахариды частично растворяются под действием уранилацетата с низким рН). После инкубации с кроличьими антителами IgG против рецептора АХ в содержащих большое количество рецепторов мешочках обнаруживаются множественные везикулы с присоединенным «пушистым покрытием» (рис. 18, Б), подобным наблюдавшемуся ранее на соединительных складках и везикулярных остатках складок в препаратах, полученных у пациентов с миастенией. При инкубации с конъюгированными с ферритином антикроличьими IgG немеченые, контрольные, микромешочки, содержащие большое количество рецепторов, не связывают комплексов ферритин — антитело (см. рис. 16, В, отмечены стрелками). Однако, если микромешочки предварительно подвергнуты мечению кроличьим антирецепторным IgG и только затем инкубированы с ферритинин — конъюгированными козыми антителами против кроличьего IgG, удается наблюдать меченные ферритином микромешочки (рис. 18, Г, Д), что позволяет, таким образом, идентифицировать связанное «пушистое покрытие» (рис. 18, Б) как специфичный по отношению к рецептору АХ IgG, а место связывания — как белок рецептора АХ. Эта же методика была использована для установления взаимосвязи специфических частей, обнаруживаемых методом замораживания-скальвания, с иммунологически идентифицированными рецепторами АХ [47]. Препараты меченных ферритином микромешочков были обработаны замораживанием-скальванием, полученные реплики окрашены, а затем залиты смолой и нарезаны для обычного электронно-микроскопического исследования. Таким образом, на одном препарате оказалось возможным наблюдать комплексы ферритин — антитело, интактные и сколотые мембраны (рис. 18, Ж). Как показал стереоскопический анализ, комплексы ферритин — антитело связаны с углублениями на Е-стороне, комплементарными четко выраженному классу частиц размером 7—9 нм Р-стороны, что позволяет идентифицировать их как два комплементарных изображения ре-

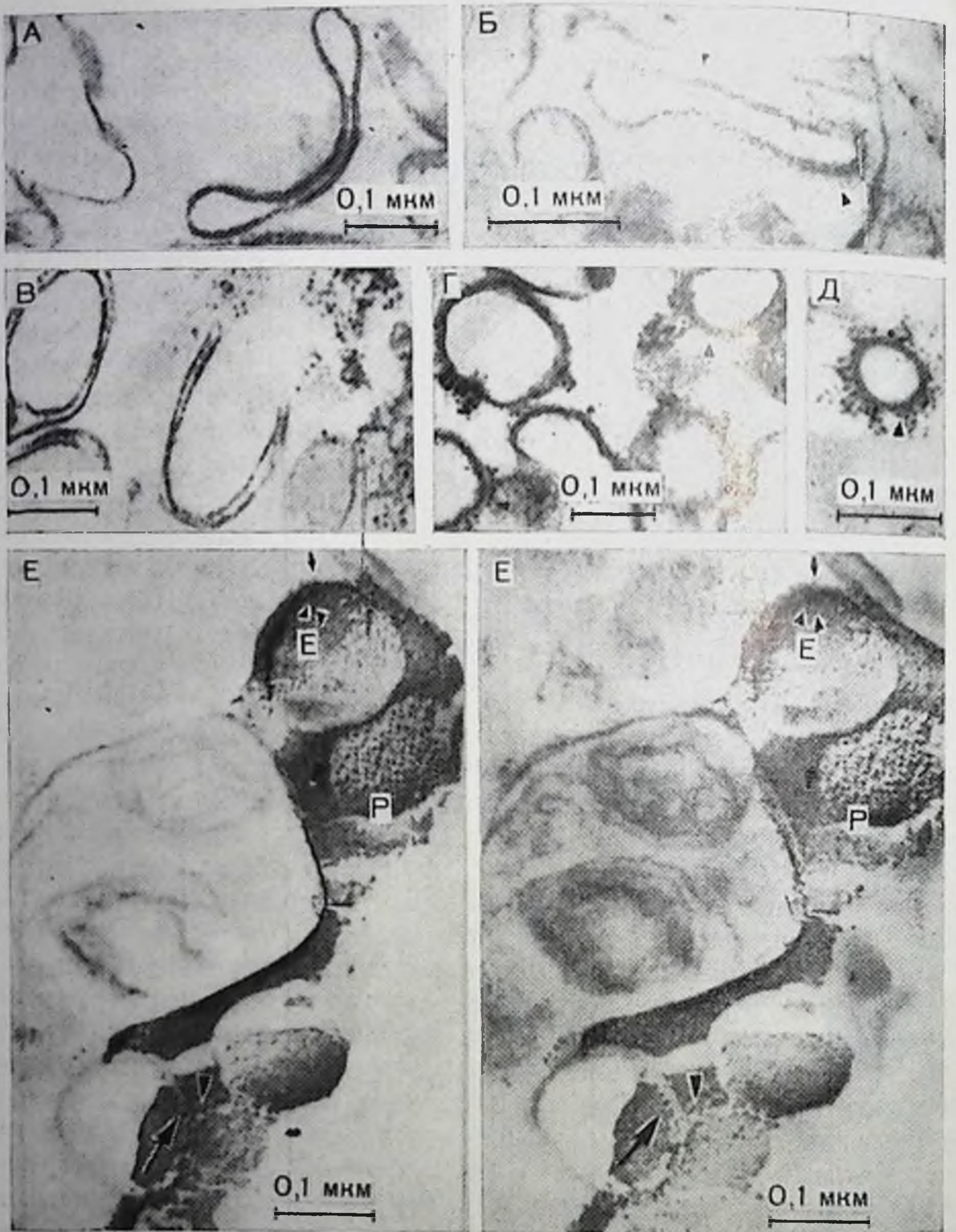


Рис. 18. Последовательные этапы идентификации антител против рецептора ацетилхолина.

А — препарат обогащенных рецепторами «микромешочков» из *Torpedo ocellata*; Б — тот же препарат после инкубации с очищенным кроличьим антирецепторным IgG. Обнаруживается присоединенное «пушистое покрытие»; В — препарат немеченных «микромешочков» после инкубации с антикроличьим козьим IgG. Обнаруживаются связанные меченные ферритином антитела; Г, Д — «микромешочки», подвергнутые действию антирецепторного IgG кролика и затем прореагировавшие с конъюгированными с ферритином антикроличьими IgG козы. Обнаруживается присоединение электронно-плотных меченных ферритином антител. Ув.: А — 119 000, Б — 161 500, В — 102 000, Г — 106 200, Д — 14 000, Е — идентификация специфических частиц на изображениях, полученных методом замораживания—скальвания и комплементарных углублений как иммунологически определенных рецепторов ацетилхолина. Препарат, аналогичный изображенному на рис. 18, Г, был обработан по методу замораживания—скальвания, реплицирован, оттаян и немедленно подготовлен к изучению методом тонких срезов. Наблюдение ферритиновых меток на части изображений, соответствующей тонкому срезу (стрелка), на изображении, полученном методом замораживания—скальвания (большая головка стрелки), и не-

цепторов АХ Torpedo [9]. Более того, хотя трудно достичь выделения деталей под слоем платины, удалось различить дополнительные гранулы ферритина (показаны стрелкой с точкой), связанные с перасщепленными мембранами в непосредственной близости от экспонированных на Р-стороне фрагментов частиц размером 7—9 нм. И, наконец, на участках, где меченые мембраны раскелоты поперек (показано большими стрелками; следует отметить, что на репликах размер ферритиновых гранул в 2—3 раза больше диаметра электроно-плотной оболочки), удалось добиться выделения трансмембранных частиц, связывающих комплекс ферритин — антитело. Таким образом, с помощью иммунологических и ультраструктурных методов удалось идентифицировать рецепторы АХ электрического органа, определить взаимосвязь обнаруживаемых методом замораживания-скалывания частиц и комплементарных им выступающих фрагментов и специфических трансмембранных белков. Проводимые в настоящее время эксперименты позволят в ближайшее время провести подобную идентификацию структуры и функции на макромолекулярном уровне и для возбуждаемых мембран нервов и мышц млекопитающих.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей главе приведен обзор данных, доказывающих, что нервно-мышечное соединение млекопитающих имеет тонкую макромолекулярную архитектуру — сложную, высокоспециализированную и локально дифференцированную, которая предназначена для выполнения основной стадии химически индуцируемого электрогенеза. Эта тонкая локальная молекулярная дифференциация в мембране заключается в непосредственной взаимосвязи структуры и функции на макромолекулярном уровне. Обобщенные данные показывают, что *in vivo* комплекс рецептора АХ и модулятора ионной проводимости двигательной концевой пластинки млекопитающих представляет собой: 1. Трансмембранный белковый комплекс, видимый на тонких срезах, который: а) стабилизируется (сшивается) при фиксации глутаральдегидом; б) не экстрагируется растворителями для липидов; в) окрашивается смесью четырехоксида осмия и ферроцианида калия; г) пронизывает мембрану, входит в синаптическую щель и погружен в электроно-плотную оболочку соединительной складки; д) ассоциирован с филаментами и поперечными мостиками; е) связывает конъюгированные с ферритином антирецепторные антитела. 2. Частицы размером 10 нм, видимые на репликах, полученных методом замораживания-скалывания, которые: а) имеют плотность популя-

←

посредственно под поверхностью реплики (стрелка с точкой) позволяет приписать рецепторные функции классу специфических частиц размером 7—9 нм, комплементарным им углублениям размером 3—6 нм (маленькие головки стрелок) и сопряженным с ними трансмембранным образованиям, позитивно контрастированным на тонких срезах (большие стрелки); ув. 127 500.

ции 2000—4000 частиц в  $1 \text{ мкм}^2$ ; б) предпочтительно локализируются на гребнях складок; в) организованы в нерегулярные параллельные ряды; г) имеют субъединичное строение типа  $8+1$  (или  $9+1$ ); д) имеют молекулярную массу 900 000 дальтон. (Связывание комплексов ферритина — антитело с названными частицами, хотя не вызывает сомнения в микромешочках электрических органов, но еще не продемонстрировано для перво-мышечных соединений млекопитающих.)

Хотя очищенный мономер рецептора АХ из *Torpedo* имеет молекулярную массу 80 000—90 000 дальтон и исходную молекулярную массу 270 000—350 000 в разбавленном тритоне X-100 [18], получено подтверждение тому, что *in vivo* молекулярная масса функционального рецептора АХ намного больше (он представляет собой шестиугольник или пятиугольник размером 7—9 нм. В дополнение к белку, связывающему АХ, рецептор из электрического органа *Torpedo*, по данным биохимических экстракционных методов, содержит, вероятно, и другой класс макромолекул — «модулятор ионной проводимости» [1, 19]. При использовании связывания [ $^3\text{H}$ ]-пергидрогистрионикотоксина (представляющего собой специфический лиганд для модулятора ионной проводимости, входящего в состав периферического никотинового рецептора АХ) показано, что белок-модулятор тесно ассоциирован с рецепторами АХ, но обычно отделяется от него при действии тритона X-100, который представляет собой детергент, обычно применяемый для выделения рецепторов АХ. Таким образом, рецептор АХ с молекулярной массой  $\sim 300\,000$  дальтон, обычно выделяемый из *Torpedo*, по-видимому, представляет собой только часть природного и существующего *in situ* комплекса рецептора АХ и модулятора ионной проводимости, молекулярная масса которого пока еще не определена. Не опубликованы также данные относительно большего и, вероятно, более сложного рецептора АХ млекопитающих. Тем не менее данные, приведенные в настоящем разделе, позволяют установить идентичность частиц размером 10 нм, обнаруживаемых на полученных методом замораживания-скалывания изображениях, трансмембранных белков, видимых на тонких срезах, и иммунологически регистрируемых рецепторов АХ. Более того, эти данные позволяют предложить простые объяснения кажущимся несовпадениям в морфологии и числе рецепторов АХ в двигательной концевой пластинке при использовании различных методов для изучения [29, 31, 41, 48]. Мы предполагаем, что функциональный комплекс никотинового рецептора АХ и модулятора ионной проводимости представляет собой у млекопитающих *in situ* мультимолекулярный агрегат — комплекс типа  $8:1$  (или  $9:1$ ), регистрируемый методом замораживания-скалывания, и что каждая периферическая субъединица может соответствовать единичному центру связывания БТ и имеет молекулярную массу 80 000—90 000 дальтон. Центральная субъединица этого комплекса еще не идентифицирована, но может представлять собой: а) индивидуальную белковую молекулу, вероятно, белок — «моду-

лятор ионной проводимости»; б) один из девяти (или десяти) идентичных белков, входящих в состав рецептора АХ; в) гидрофильную щель между мономерными белками, которая обладает стойкостью к внутреннему разлому. С другой стороны, модулятор ионной проводимости может представлять собой часть каждой из структурных субъединиц. На основании имеющихся структурных данных пока не представляется возможным точно определить локализацию ионного канала (или каналов), который может существовать внутри каждой из структурных субъединиц или принадлежать какому-то одному их классу. В любом случае, однако, частицы размером 10 нм представляют собой (будучи зафиксированы глутаральдегидом) морфологический коррелят рецепторной активности по отношению к АХ *in vivo*.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО РАЗВИТИЯ

Структурная сложность и пространственное распределение рецепторов АХ, обсуждаемые в настоящем разделе, позволяют нам ставить вопросы, касающиеся факторов, регулирующих образование комплекса функционального рецептора АХ и модулятора ионной проводимости, механизмов, регулирующих встраивание и организацию рецепторов в процессе эмбриональной и неонатальной клеточной дифференциации, и различных (трофических?) факторов, поддерживающих тонкую макромолекулярную структуру комплекса на протяжении всей жизни животного. В настоящее время исследования многих лабораторий ведутся именно в этих направлениях.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Albuquerque E. X., Barnard E. A., Chiu T. H., Lapa A. J., Dolly J. O., Jannson S.-E., Daly J., Witkop B.* Acetylcholine receptor and ionic conductance modular sites at the murine neuromuscular junction: Evidence from specific toxin reactions. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 949—953.
2. *Albuquerque E. X., Barnard E. A., Porter C. W., Warnick J. E.* The density of acetylcholine receptors and their sensitivity in the postsynaptic membrane of muscle endplates. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2818—2822.
3. *Albuquerque E. X., McIsaac R. J.* Fast and slow mammalian muscles after denervation. — *Exp. Neurol.*, 1970, 26, 183—202.
4. *Albuquerque E. X., Rash J. E., Mayer R. F., Satterfield J. R.* An electrophysiological and morphological study of the neuromuscular junction in patients with myasthenia gravis. — *Exp. Neurol.*, 1976, 51, 536—563.
5. *Berg D. K., Hall Z. W.* Fate of  $\alpha$ -bungarotoxin bound to acetylcholine receptors of normal and denervated muscle. — *Science*, 1974, 184, 473—475.
6. *Berg D. K., Hall Z. W.* Loss of  $\alpha$ -bungarotoxin from junctional and extra-junctional acetylcholine receptors in rat diaphragm muscle *in vivo* and in organ cultures. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 252, 771—789.
7. *Birks R., Huxley H. E., Katz B.* The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1960, 150, 134—144.
8. *Branton D., Bullivant S., Gilula N. B., Karnovsky M. J., Moor H., Mühlethaler K., Northcote D. H., Packer L., Satir B., Satir P., Speth V., Staeh-*

- lin L. A., Steere R. L., Weinstein R. S.* Freeze-etching nomenclature. — *Science*, 1975, 190, 54—56.
9. *Carlaud J., Benedetti E. L., Cohen J. B., Meunier J.-C., Changeux J.-P.* Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett.*, 1973, 33, 109—113.
  10. *Chang C. C., Chuang S.-T., Huang M. C.* Effect of chronic treatment with various neuromuscular blocking agents on the number and distribution of acetylcholine receptors in the rat diaphragm. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 250, 161—173.
  11. *Chang C. C., Lee C. Y.* Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. — *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1963, 144, 241—257.
  12. *Changeux J.-P.* The cholinergic receptor protein from fish electric organ. — In: *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 6, ed. by C. L. L. Iverson, S. D. Iverson, S. H. Snyder, eds., Plenum Press, New York, 1975, p. 235—305.
  13. *Changeux J.-P., Kasai M., Lee C.-Y.* Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, 1241—1247.
  14. *Copio D., Hudson S. A., Eldefrawi M. E., Rash J. E.* Immunological and ultrastructural studies of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits (in preparation), 1978.
  15. *Dale H. H., Feldberg W., Vogt M.* Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1936, 86, 353—380.
  16. *del Castillo J., Katz B.* On the localization of acetylcholine. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1955, 128, 159—181.
  17. *Dryer F., Peper K., Akert K., Sandri C., Moor H.* Ultrastructure of the active zone in the frog neuromuscular junction. — *Brain Res.*, 1973, 62, 373—380.
  18. *Edelstein S. J., Beyer W. B., Eldefrawi A. T., Eldefrawi M. H.* Molecular weight of the acetylcholine receptors of electric organs and the effect of Triton X-100. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 6101—6106.
  19. *Eldefrawi A. T., Eldefrawi M. E., Albuquerque E. X., Oliveira A. C., Mansour N., Adler M., Daly J. W., Brown G. B., Burgmeister W., Witkop B.* Perhydrohistrionicotoxin: A potential ligand for the ion conductance modulator of the acetylcholine receptor. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 2172—2176.
  20. *Eldefrawi M. E., Eldefrawi A. T., Shamo A. E.* Molecular and functional properties of the acetylcholine receptor. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 264, 183—202.
  21. *Ellisman M. H., Rash J. E.* Studies of excitable membranes. III. Freeze-fracture examination of the membrane specializations at the neuromuscular junction and in the non-junctional sarcolemma after denervation. — *Brain Res.*, 1977, 137, 197—206.
  22. *Ellisman M. H., Rash J. E., Staehelin L. A., Porter K. R.* Studies of excitable membranes. II. A comparison of specializations at neuromuscular junctions and non-junctional sarcolemmas of mammalian fast and slow twitch muscle fibers. — *J. Cell Biol.*, 1976, 68, 752—774.
  23. *Engel A. G., Lambert E. H., Howart F. M.* Immune complexes (IgG and C<sub>3</sub>) at the motor endplate in myasthenia gravis. Ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiological correlations. — *Mayo Clinic Proc.*, 1977, 52, 267—280.
  24. *Engel A. G., Santa T.* Motor endplate fine structure. Quantitative analysis in disorders of neuromuscular transmission and prostigmine induced alterations. — In: *New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology* (ed. by Desmedt J. E.), S. Karger, Basel, 1973, vol. 1, p. 196—228.
  25. *Engel A. G., Tsujihata M., Lindstrom J. M., Lennon V. A.* The motor endplate in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis. A quantitative ultrastructural study. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 274, 60—79.



26. *Fambrough D., Draehman D. B., Satyamurti S.* Neuromuscular junction in myasthenia gravis. Decreased acetylcholine receptors. — *Science*, 1973, 182, 293—295.
27. *Fatt P., Katz B.* An analysis of the endplate potential recorded with an extracellular electrode. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1951, 115, 320—370.
28. *Fertuck H. C., Salpeter M. M.* Localization of acetylcholine receptor by <sup>125</sup>I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 1376—1378.
29. *Fertuck H. C., Salpeter M. M.* Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after <sup>125</sup>I- $\alpha$ -bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junctions. — *J. Cell. Biol.*, 1976, 69, 144—158.
30. *Hampar B., Hsu K. C., Martos L. M., Walker J. L.* Serologic evidence that a herpes-type virus is the etiologic agent of "heterophile-positive infectious mononucleosis". — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 1407—1411.
31. *Heuser J. E., Reese T. S., Landis M. D.* Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. — *J. Neurocytol.*, 1974, 3, 103—131.
32. *Hodgkin A. L., Huxley A. F.* A quantitation description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1952, 117, 500—544.
33. *Hudson S. A., Rash J. E., Copio D., Eldefrawi M.* Localization of antibodies to acetylcholine receptors in human and experimental autoimmune myasthenia gravis by ferritin-antibody sandwich technique (in preparation), 1978.
34. *Koelle G. B.* The elimination of enzymatic diffusion in the histochemical localization of cholinesterase and a survey of their cellular distribution. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1951, 103, 153—171.
35. *Kuffler S. W.* Specific excitability of the endplate region in normal and denervated muscle. — *J. Neurophysiol.*, 1943, 57, 1—90.
36. *Langley J. N.* On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances. — *J. Physiol.*, 1907, 36, 347—384.
37. *Lindstrom J.* Immunological studies of acetylcholine receptors. — *J. Supramol. Struct.*, 1976, 4, 389 (349)—403 (363).
38. *Nickel E., Potter L. T.* Ultrastructure of isolated membranes of Torpedo electric tissue. — *Brain Res.*, 1973, 57, 508—517.
39. *Patrick J., Lindstrom J. M.* Autoimmune response to acetylcholine receptor. — *Science*, 1973, 180, 871—872.
40. *Peper K., Dryer F., Sandri C., Akert K., Moor H.* Structure and ultrastructure of the frog motor endplate: A freeze-etching study. — *Cell tissue Res.*, 1974, 149, 437—455.
41. *Porter C. W., Barnard E. A.* The density of cholinergic receptors at the endplate postsynaptic membrane: Ultrastructural studies in two mammalian species. — *J. Membrane Biol.*, 1975, 20, 31—49.
42. *Porter C. W., Barnard E. A., Chiu T. H.* The ultrastructural localization of cholinergic receptors at the mouse motor endplate. — *J. Membrane Biol.*, 1973, 14, 383—402.
43. *Rastery M. A., Vandlen R., Michaelson D., Bode J., Moody T., Chao Y., Reed K., Deutsch J., Duguid J.* The biochemistry of an acetylcholine receptor. — *J. Supramol. Struct.*, 1974, 2, 528—592.
44. *Rang H. P.* Acetylcholine receptors. — *Quart. Rev. Biophys.*, 1975, 7, 283.
45. *Rash J. E.* Staining of membrane integral proteins by mixed osmium-ferricyanide solution (in preparation), 1978.
46. *Rash J. E., Albuquerque E. X., Hudson C. S., Mayer R. F., Satterfield J. R.* Studies of human myasthenia gravis: Electrophysiological and ultrastructural evidence compatible with antibody attachment to the acetylcholine receptor complex. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 4584—4588.
47. *Rash J. E., Copio D. S., Eldefrawi M. H., Hudson C. S.* Practical labelling techniques for freeze-fracture. — *J. Cell Biol.*, 1977, 75, 247a.
48. *Rash J. E., Ellisman M. H.* Studies of excitable membranes. I. Macromolecular specializations of the neuromuscular junction and the non-junctional sarcolemma. — *J. Cell Biol.*, 1974, 63, 567—586.

49. *Rash J. E., Ellisman M. H., Staehelin L. A.* Freeze-cleaved neuromuscular junctions: Macromolecular architecture of post-synaptic membranes of normal vs. denervated muscle. — *J. Cell Biol.*, 1973, 59, 280a.
50. *Rash J. E., Ellisman M. H., Staehelin L. A., Porter K. R.* Molecular specializations of excitable membranes in normal, chronically denervated, and dystrophic muscle fibers. — *Excerpta Medica Int. Cong. Series 333 (Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy II)*, 1974, 271—289.
51. *Rash J. E., Hudson C. S., Albuquerque E. X., Mayer R. F., Satterfield J. R.* Morphological and electrophysiological studies of neuromuscular junctions from humans with myasthenia gravis. — *J. Cell Biol.*, 1976, 70, 303a.
52. *Rash J. E., Warnick J. E., Ellisman M. H., Albuquerque E. X.* Freeze-fracture stereoscopy of quiescent, stimulated, and toxin-treated neuromuscular junctions. — *J. Cell Biol.*, 1975, 67, 354a.
53. *Sanders D. B., Schleifer L. S., Eldefrawi M. E., Norcross N. L., Cobb E. E.* An immunologically induced defect of neuromuscular transmission in rats and rabbits. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1976, 274, 319—336.
54. *Singer S. J., Nicolson G. L.* The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. — *Science*, 1972, 175, 720—731.
55. *Steere R.* Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. — *J. Biochem. Biophys. Cytol.*, 1957, 3, 45—60.
56. *Valentine R. C., Green N. M.* Electron microscopy of an antibody-hapten complex. — *J. Mol. Biol.*, 1967, 615—617.
57. *Waser P. G.* Receptor localization by autoradiographic techniques. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1967, 144, 737—753.
58. *Waser P. G., Lüthi U.* Autoradiographische Lokalisation von <sup>14</sup>C-Calobassen-Curarin I und <sup>14</sup>C-Decamethonium in der Motorischen Endplatte. — *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1957, 112, 272—296.

## ФИЗИОЛОГИЯ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЦЕТИЛХОЛИНА

РОБЕРТ Д. ПУРВЕС  
(ROBERT D. PURVES)

*Отдел анатомии и эмбриологии, Университетский колледж Лондона,  
Лондон WC1E6BT, Англия*

Различие между мускариновым и никотиновым действием АХ было обнаружено в процессе наблюдения эффектов, вызываемых лекарствами типа агонистов или антагонистов [32, 63]. Таким образом, эта классификация рецепторов АХ основана на фармакологических критериях [7, 19, 54]. В прошлом считалось, что результаты активации обоих типов рецепторов в принципе одинаковы. В настоящее время оказывается, что это не так, в частности существует значительная разница в скорости ответа. В настоящем разделе будет приведен обзор данных по распределению мускариновых рецепторов и некоторых их свойств, представляющих интерес с физиологической точки зрения.

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Мускариновые рецепторы АХ широко распространены в периферических тканях, обладающих парасимпатической иннервацией (внутриглазной, бронхиальной, кишечной, тканях мочевой системы, некоторых выскляризованных гладких мышцах, мышце

сердца, внешесекреторных железах). Кроме того, мускариновый ответ может быть зарегистрирован и в тканях, для которых парасимпатическая иннервация, по выражению Dale, «анатомически невероятна». Так, например, АХ вызывает расширение сосудов во всей артериальной сети. В некоторых случаях, например в кровеносных сосудах мышц и в потовых железах, имеется холинэргическая иннервация симпатическими нервами. Очевидно, однако, что полностью функциональные мускариновые рецепторы могут существовать и в вообще не иннервированных тканях. Лучшим примером, вероятно, может служить амниотическая гладкая мускулатура птиц [31]. В некоторых невозбуждаемых клетках также наблюдается мускариновая реакция [56].

Мускариновыми рецепторами обладают и многие нейроны. Микроинъекторные эксперименты на центральной нервной системе продемонстрировали преобладание мускариновых эффектов над никотиновыми в ядрах хвоста и в коре головного мозга [29, 43], но во многих местах разграничить эти два типа рецепторов очень непросто. По-видимому, оба рецептора могут существовать на одних и тех же нейронах, причем эта возможность получила подтверждение в случае симпатических ганглиев [49, 99] и клеток Рэншоу спинного мозга [30].

Изучение связывания меченых мускариновых антагонистов также дает информацию о распределении рецепторов [14] в мозгу [52, 68] и в периферических тканях [100], полученную в результате проведения эксперимента по связыванию, что хорошо согласуется с более широко известными фармакологическими данными.

Никотиновые рецепторы на иннервированных скелетных мышцах и нейронах расположены в основном в непосредственной близости (в пределах нескольких микрон) от пресинаптического окончания нерва [50, 68]. В настоящее время информация о внутриклеточной локализации мускариновых рецепторов вообще практически отсутствует. Мы даже не знаем, находятся ли рецепторы в такой ткани, как гладкомышечная, на каждой клетке. Было показано, что мускариновые агонисты вызывают одинаковой амплитуды деполяризацию во всех клетках гладких мышц кишечника [16], что было интерпретировано как чувствительность всех или большинства клеток [84]. Однако индивидуальные клетки в этой ткани электрически связаны с соседними клетками. Теоретически установлено [82], что островное распределение рецепторов не должно выражаться в пространственной неоднородности деполяризации, если только островки рецепторов не расположены на расстоянии, большем, чем определяемое диэлектрической постоянной, т. е. порядка нескольких миллиметров.

Самый многообещающий метод для выявления детальной локализации мускариновых рецепторов — это, по-видимому, автордиография препаратов тканей, обработанных мечеными антагонистами [72, 86], хотя имеющаяся на сегодняшний день способность разрешения еще явно недостаточна. Дальнейшее развитие этого метода представляет большой интерес.

Успехи, достигнутые в выделении субклеточных фракций, способных связывать мускариновые лиганды, были обобщены в обзорах Fewtrell [39], Birdsall и Hulme [14]. Особое затруднение вызывает получение растворимых фракций, поскольку обычно используемые для этих целей детергенты разрушают их связывающую способность. Недавно было показано, что тем не менее центры связывания могут быть переведены в раствор под действием высоких концентраций соли [3, 24].

### ФИЗИОЛОГИЯ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Явления, происходящие вслед за активацией мускариновых рецепторов, в разных тканях заметно различаются и могут приводить даже к электрическим изменениям противоположного знака. В большинстве гладких мышц АХ вызывает деполяризацию, но в мышце сердца происходит гиперполяризация мембраны. Сообщалось также о существенных различиях в изменениях ионной проводимости; эти данные далее будут обсуждены более подробно.

#### Гладкая мышца

Много исследований было проведено с использованием меченых ионов для измерения возникающих вслед за стимуляцией мускариновых рецепторов изменений ионных потоков. Результаты этих исследований не всегда легко поддаются интерпретации, поскольку в гладкой мышце измеряемые потоки не обязательно являются трансмембранными. Кроме того, действие агониста вызывает увеличение изменений потоков, являющееся вторичным по отношению к изменениям мембранного потенциала; эта сложность может быть преодолена благодаря деполяризации мышцы в изотоническом растворе  $K_2SO_4$  [36], хотя эта процедура резко нарушает нормальную физиологию. Результаты работ по изучению потоков в мышцах кишечника свидетельствуют о резком увеличении проницаемости мембран для калия. Электрофизиологические эксперименты, в которых изменяли внеклеточные концентрации различных ионов, показали, что имеет место и увеличение натриевой проницаемости [16]. Повышение проницаемости для хлорида калия было отмечено Durbin и Jenkinson [36], но этот результат не подтвержден электрофизиологическими исследованиями [16]. Эти и другие количественные несоответствия обсуждены Rang [84].

Есть основания полагать, что мускариновые агонисты могут вызывать сокращение гладких мышц по механизмам, не связанным с повышением ионной проницаемости. Наиболее вероятно, что этот механизм связан с мобилизацией кальция из внутриклеточного пула [35, 37].

## Сердечная мышца

Тормозное действие АХ опосредуется повышенем проницаемости мембран для ионов калия [97], которое не зависит ни от времени, ни от напряжения. Это повышение проницаемости вызывает вторичные, хорошо известные электрические явления, а именно повышение максимального диастолического потенциала, понижение падения препотенциалов синусового узла и укорочение потенциала действия. Отрицательный инотропный эффект в свою очередь является следствием в основном укорочения потенциала действия [95]. В дополнение к этому комплементарным эффектом АХ является понижение амплитуды медленного входного (кальциевого) тока [46, 57].

## Нейроны

Возбуждающий эффект стимуляции мускариновых рецепторов по меньшей мере в некоторых нейронах не является следствием открывания ионных каналов. В симпатических ганглиях [88] и корковых нейронах [65] мускариновые агонисты вызывают деполяризацию, сопровождающуюся пониженной мембранной проводимостью. Приемлемое объяснение этого явления заключается в том, что деполяризация вызывается калиевой проницаемостью, хотя оно и вызывает определенные возражения [67].

## Внешнесекреторные железы

Хотя стимуляция холинергических нервов или мускариновые агонисты вызывают изменения мембранного потенциала в слюнных и поджелудочной железах, взаимосвязь этих явлений с секреторным ответом остается неясной [79]. Изменение потенциала («секреторный потенциал») может быть деполяризационным, гиперполяризационным или даже бифазным. Вход ионов кальция необходим для секреции амилазы из околоушной железы, что может быть продемонстрировано экспериментами с мечеными атомами вслед за стимуляцией карбахолом [83]. Стимуляция мускариновых рецепторов вызывает резкий подъем выхода калия из подчелюстной железы крыс [73].

Этот набор разнообразных ответов резко отличается от стереотипного ответа на стимуляцию никотиновых рецепторов, в котором начальным этапом является открывание ионных каналов, позволяющее катионам (в основном калию и натрию) течь в направлении понижения их электрохимических градиентов [38, 91, 94]. Таким образом, никотиновые рецепторы позвоночных являются исключительно возбудимыми, хотя у некоторых беспозвоночных обнаружен чувствительный к кураре ингибиторный ответ на АХ [1].

Мускариновые реакции, как возбуждающие, так и тормозные, являются медленными. По определению Dale [35], «такие эффекты имеют длительный латентный период, медленно достигают максимума при повторяющейся стимуляции нерва и их длительность намного превосходит период этой стимуляции». Они примерно в 1000 раз медленнее никотиновых реакций, имеющих характер «внезапной вспышки». Так, например, минимальная латентность никотиновых потенциалов концевой пластинки составляет 0,22 мс [55] и даже наиболее медленные никотиновые синаптические потенциалы (в симпатических ганглиях амфибий) не превышают по продолжительности 100 мс [96]. Искусственное нанесение АХ на двигательную концевую пластинку может вызывать изменение потенциала в течение 0,15 мс [60, 75].

Латентность опосредованных нервами мускариновых реакций у млекопитающих составляет 100 мс в сердце [20], гладких мышцах кишечника [41], слюнных железах [28]. Торможение биений сердца лягушки вслед за стимуляцией блуждающего нерва становится заметным только через 0,5 с [34], т. е. достаточно длительное время, которое может заметить хороший наблюдатель [41, с. 97]. Время возбуждающего или тормозного действия при стимуляции одиночного нерва также велико, продолжительность реакции составляет для разных препаратов от 0,5 до 10 с [41, 34, 81].

Эти наблюдения над опосредованными первыми реакциями указывают на некоторые кинетические особенности ответа мускариновых рецепторов, хотя и не доказывают их однозначно, поскольку принципиально иные факторы, например медленная нервная проводимость или задержка в выделении АХ, могут определять указанную латентность. Более прямое доказательство получено в результате экспериментов с использованием ионофоретического нанесения АХ. В первом исследовании такого рода, специально проведенном для изучения природы латентности, шпатель с АХ аккуратно помещали вблизи чувствительной клеточной мембраны в культуре гладких мышц [80]. Минимальная латентность возбуждения в ответ на нанесение порции АХ всегда составляла более 100 мс даже при условии, что АХ должен был достичь соответствующих рецепторов в течение всего нескольких миллисекунд. Последующие эксперименты на разных тканях подтвердили, что искусственное действие мускариновых агонистов не может вызвать реакции менее чем через 100 мс в гладкой мышце [18], предсердии лягушки [81], культуре мышцы сердца [53] и поджелудочной железе [78]. В центральной нервной системе мускариновые эффекты ионофоретически нанесенного АХ не появляются до истечения многих секунд после начала действия стимула [29]. Детальный анализ центрального действия стимулов пока не изучен вследствие сложности исключения задержек в поступлении стимулов.

Разумным является заключение, что кинетика мускариновых реакций не определяется поступлением агониста к центрам рецепции. Процесс, ответственный за наличие длительной латентности, пока не идентифицирован, некоторые возможные механизмы обсуждаются ниже.

## МЕДИАТОРЫ МУСКАРИНОВЫХ ОТВЕТОВ

Одним из основных претендентов на роль медиатора мускариновых реакций является гуанозин — 3',5'-циклический монофосфат (цГМФ). В соответствии с существующей гипотезой связывание агонистов с мускариновыми рецепторами активирует гуанилциклазу и таким образом повышает внутриклеточный уровень цГМФ. Итоговые электрические и другие эффекты являются результатом фосфорилирования белка, катализируемого цГМФ [48, 70]. Большая, хотя и некритически подобранная группа фактов подтверждает основную идею о том, что цГМФ функционирует в качестве «второго мессенджера». Во многих случаях удалось прямо зарегистрировать повышенные уровни цГМФ после обработки мускариновыми агонистами [43, 45, 61, 85]. цГМФ или его производные могут имитировать мускариновые ответы в некоторых тканях, особенно в сердце [76, 98] и некоторых нейронах [92].

Следует сделать некоторые предостережения. Критерии, предложенные Sutherland для установления того, является ли циклический нуклеотид вторым мессенджером [93], применялись недостаточно строго, что привело к расхождениям в имеющихся результатах. Внутриклеточное введение цГМФ методом ионофореза в спинальные двигательные нейроны не смогло имитировать напосимого снаружи АХ [66]. По утверждению Stone и Taylor [92], однако, неизвестно, являются ли нейроны, использованные в этих экспериментах, холинергически иннервированными, т. е. зафиксированные реакции могут не иметь отношения к нормальной физиологии. Аналогичные соображения могут быть высказаны по поводу расхождения между уровнями цГМФ и сокращением в *vas deferens* [90]. Этот орган имеет незначительную холинергическую иннервацию, хотя ее физиологическая значимость неизвестна.

Более серьезным возражением является обнаружение факта, что повышение уровня цГМФ зависит от присутствия внеклеточных ионов кальция [5, 9, 62, 89], т. е. синтезу цГМФ должен предшествовать вход кальция [14, 26]. Прямое доказательство этого положения, однако, отсутствует, и это возражение, по-видимому, не является фатальным для гипотезы о втором мессенджере. Возражение тем не менее может быть высказано в том смысле, что кальций сам по себе может быть вторым мессенджером [12, 64], и цГМФ может не иметь прямого инициирующего действия в конечном ответе. Однако некоторые мускариновые реакции относи-

тельно нечувствительны к удалению внеклеточного кальция. Это относится к стимуляции выхода калия в гладкой мышце [22] и к распаду фосфатидилинозита [74]. Последняя из названных реакций является прямым следствием активации мускариновых (и других) рецепторов [59].

Пока неизвестно, в какой стадии в цепи ответа возникают разнообразные физиологические эффекты, поэтому вполне возможно, что различные эффекты опосредованы совершенно различными путями. Nawrath [77] показано, что аналог цГМФ может понижать кальциевый ток в сердечной мышце, но не может имитировать другой эффект АХ, а именно повышение проницаемости мембран для калия.

### ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Интересный вопрос о гетерогенности рецепторов детально обсужден Birdsall и Hulme [14]. Существуют следующие доказательства существования различных типов мускариновых рецепторов: а) эксперименты по изучению связывания показали, что связывание носит сложный характер и не может быть охарактеризовано одной константой связывания; б) кривые зависимостей доза — ответ для различных реакций, вызываемых мускариновыми агонистами, выявляют для разных тканей заметно различающиеся значения  $ED_{50}$ , хотя само по себе это наблюдение и не доказывает гетерогенности рецепторов, поскольку наблюдаемые различия могут возникнуть на любом участке цепи, ведущей от стимула к ответу; в) две мускариновые реакции, характерные для гладкой мышцы (сокращенные и выход калия), различаются по расположению вызывающих их агонистов в ряду эффективности действия [21]; г) в гладкой мышце кишечника лишь часть изменений мембранной проводимости, возникающих при действии агониста, зависит от напряжения, тогда как другая его часть не зависит от разности потенциалов [16]; д) некоторые исследователи заявили о существовании мускариновых реакций в гладкой мышце, латентный период которых составляет менее 15 мс, что значительно короче обычного времени ответа — около 100 мс [42, 58].

Эти результаты пока не заставляют нас выработать классификацию внутри самих мускариновых рецепторов. Связывание и фармакология антагонистов отличаются гораздо большей однородностью, чем это обнаружено для лекарств, действующих по типу агонистов [8, 10, 40]. Мускариновые рецепторы из большинства тканей связывают атропин с константой диссоциации порядка аномалий. Относительное сходство связывания антагонистов указывает на то, что связывание происходит по центрам, в определенном смысле отличающимся от центров связывания агонистов; это же подтверждается и гораздо более высоким сродством рецепторов по отношению к антагонистам [6].



## ФУНКЦИЯ МУСКАРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Разделение рецепторов АХ на мускариновые и никотиновые основано на фармакологических критериях, поэтому биологическая значимость его не является очевидной. Мы предполагаем, что физиологически важным различием между этими двумя типами рецепторов является скорость их ответа [81]. По-видимому, никотиновые рецепторы предназначены давать быстрые и непродолжительные эффекты и не обнаруживают суммирования во времени ответов на последовательные нервные импульсы. Мускариновые рецепторы, наоборот, реагируют длительными и медленными ответами, продолжительность которых превосходит интервал между последовательными импульсами. Таким образом, становится возможным суммирование ответов во времени которое исключительно важно для обеспечения равномерного управления, например, скоростью сердечных сокращений.

Приведенные рассуждения подтверждаются двумя последующими примерами.

Gaskell [44], изучая иннервацию сердца черепахи, обнаружил длительное вагусное торможение: «Лучшим стимулом, заставляющим действовать блуждающий нерв, является серия единичных индуцирующих импульсов, предъявляемых каждые 5 с». У млекопитающих, правда, вагусное торможение сердца не продолжается так долго, как в описанном случае, однако и здесь оно достаточно длительно, чтобы обеспечить суммирование реакций во времени даже при низких возбуждающих частотах автономных нервов.

Клетки Реншоу получают холинергическую иннервацию от спинальных двигательных нейронов и обладают обоими никотиновыми и мускариновыми рецепторами. При изучении с помощью обычных экспериментальных стимулов, например, единичных спонтанно индуцированных пресинаптических серий мышечных сокращений мускариновые реакции не обнаруживаются. Ryall и Haas [87] недавно показали, что для стимулирования мускариновых реакций гораздо более эффективен естественный возбуждающий вход (непрерывное раздражение). Важным различием между искусственным и естественным стимулированием является тот факт, что последнее позволяет суммировать индивидуальные и слабые мускариновые реакции во времени. Латентный период как таковой не так уж существен в периферических органах. Остается, однако, неясным, может ли он использоваться для временного регулирования в центральной нервной системе.

Адренорецепторы [2] и рецепторы для гистамина [15] могут быть разделены на два класса с различной фармакологией. Можно ли соотнести эту классификацию с различными скоростями ответа? Есть данные, что некоторые  $\alpha$ -адренергические эффекты являются быстрыми; латентный период потенциалов соединения в *vas deferens* составляет только несколько миллисекунд [71]. По меньшей мере некоторые из  $\beta$ -реакций являются медленными, ла-

тентный период возбуждающих реакций сердечной мышцы в ответ на ионофоретически нанесенные катехоламины составляет несколько секунд, а реакции на краткие стимулы длятся минуты [53]. Существуют, однако, сомнения, что быстрые реакции в *vas deferens* действительно опосредованы  $\alpha$ -рецепторами [4, 51]. Кроме того, довольно медленные  $\alpha$ -реакции обнаружены в печени [47] и *apocossygeus* [27]. Неясно также, существуют ли кинетические различия между рецепторами  $H_1$ - и  $H_2$ -гистаминов, хотя последние, по-видимому, подобно  $\beta$ -адренорецепторам, используют в качестве второго мессенджера цАМФ [25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мускариновые рецепторы АХ широко распространены в организме. Физиологические эффекты, опосредованные мускариновыми рецепторами, резко отличаются от эффектов, опосредованных никотиновыми рецепторами. Предполагается, что физиологическими различиями, в частности в скорости ответа, можно объяснить существование двух типов рецепторов. Возможно, что мускариновые рецепторы вызывают соответствующие реакции через промежуточный цГМФ, подобно  $\beta$ -адренорецепторам.

Постулирование наличия второго мессенджера для мускариновых реакций не позволяет точно объяснить их длительный латентный период и временной характер, хотя, по-видимому, хорошо согласуется с подобными данными. Когда впервые была предложена гипотеза химической передачи в синапсе, трудно было согласовать ее с быстрыми никотиновыми ответами, тогда как медленных мускариновых реакций, по мнению Dale [33], можно было ожидать: «Совершенно нетрудно обрисовать их как вызываемые химическим медиатором, высвобождающимся из нервных окончаний». Парадоксально, но сейчас ситуация изменилась на диаметрально противоположную.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams D. J., Gage P. W., Hamill O. P. Voltage sensitivity of inhibitory postsynaptic currents in *Aplysia*. — *Brain Res.*, 1976, 115, 506—511.
2. Ahlquist R. P. A study of the adrenotropic receptors. — *Am. J. Physiol.*, 1948, 153, 586—600.
3. Alberts P., Bartfai T. Muscarinic acetylcholine receptor from rat brain. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 1543—1547.
4. Ambache N., Aboo Zar M. Evidence against adrenergic motor transmission in the guinea-pig *vas deferens*. — *J. Physiol.*, 1971, 216, 359—389.
5. Andersson R., Nilsson K., Wikberg J., Johansson S., Mohme-Lundholm E., Lundholm L. Cyclic nucleotides and the contraction of smooth muscle. — *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, 1975, 5, 491—518.
6. Ariens E. J., Beld A. J. The receptor concept in evolution. — *Biochem. Pharmacol.*, 1977, 26, 913—918.
7. Barlow R. B. *Introduction to Chemical Pharmacology*, 2nd ed. Methuen, London, 1964.
8. Barlow R. B., Berry K. J., Glenton P. A. M., Nikolaou N. M., Soh K. S. A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine

- receptors in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29°C and in ileum at 29°C and 37°C. — *Br. J. Pharmacol.*, 1976, 58, 613—620.
9. *Beam K. G., Nestler E. J., Greengard P.* Increased cyclic GMP levels associated with contraction in muscle fibres of the giant barnacle. — *Nature*, 1977, 267, 534—536.
  10. *Beld A. J., van der Hoven S., Wouterse A. C., Zegers M. A. P.* Are muscarinic receptors in the central and peripheral nervous system different? — *Eur. J. Pharmacol.*, 1975, 30, 360—363.
  11. *Bennett M. R.* Transmission from intramural excitatory nerves to the smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. — *J. Physiol.*, 1966, 185, 132—147.
  12. *Berridge M. J.* The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. — *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, 1975, 6, 1—98.
  13. *Bird S. J., Aghajanian G. K.* The cholinergic pharmacology of hippocampal pyramidal cells: A microiontophoretic study. — *Neuropharmacology*, 1976, 15, 273—282.
  14. *Birdsall N. J. M., Hulme E. C.* Biochemical studies on the muscarinic acetylcholine receptor. — *J. Neurochem.*, 1976, 27, 7—16.
  15. *Black J. W., Duncan W. A. M., Durant C. J., Ganellin C. R., Parsons E. M.* Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. — *Nature*, 1972, 236, 385—390.
  16. *Bolton T. B.* The depolarizing action of acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle. — *J. Physiol.*, 1972, 220, 647—671.
  17. *Bolton T. B.* Effects of stimulating the acetylcholine receptor on the current-voltage relationships of the smooth muscle membrane studied by voltage clamp of potential recorded by microelectrode. — *J. Physiol.*, 1975, 250, 175—202.
  18. *Bolton T. B.* On the latency and form of the membrane responses of smooth muscle to the iontophoretic application of acetylcholine or carbachol. — *Proc. R. Soc. B.*, 1976, 194, 99—119.
  19. *Brimblecombe R. W.* Drug Actions on Cholinergic Systems. Macmillan, London, 1974.
  20. *Brown G. L., Eccles J. C.* The action of a single vagal volley on the rhythm of the heart beat. — *J. Physiol.*, 1934, 82, 211—241.
  21. *Burgen A. S. V., Spero L.* The action of acetylcholine and other drugs on the efflux of potassium and rubidium from smooth muscle of the guinea-pig intestine. — *Br. J. Pharmacol.*, 1968, 34, 99—115.
  22. *Burgen A. S. V., Spero L.* The effects of calcium and magnesium on the response of intestinal smooth muscle to drugs. — *Br. J. Pharmacol.*, 1970, 40, 492—500.
  23. *Burnstock G., Bell C.* Peripheral autonomic transmission. — In: *The Peripheral Nervous System*, ed. by J. I. Hubbard, 1974, pp. 277—327. Plenum Press, New York.
  24. *Carson S., Godwin S., Massoulie J., Kato G.* Solubilisation of atropine-binding material from brain. — *Nature*, 1977, 266, 176—178.
  25. *Chand P. N., Eyre P.* Classification and biological distribution of histamine receptor sub-types. — *Agents and Actions*, 1975, 5, 277—295.
  26. *Christophe J. P., Frandsen E. K., Conlon T. P., Krishna G., Gardner J. D.* Action of cholecystinin, cholinergic agents and A-23187 on accumulation of guanosine 3',5'-monophosphate in dispersed guinea-pig pancreatic acinar cells. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 4640—4645.
  27. *Creed K. E., Gillespie J. S., Muir T. C.* The electrical basis of excitation and inhibition in the rat anococcygeus muscle. — *J. Physiol.*, 1975, 245, 33—47.
  28. *Creed K. E., McDonald I. R.* The effects of temperature and 2,4-dinitrophenol on transmembrane potentials of submandibular acinar cells. — *J. Physiol.*, 1975, 247, 521—535.
  29. *Curtis D. R., Crawford J. M.* Central synaptic transmission — microiontophoretic studies. — *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1969, 9, 209—240.
  30. *Curtis D. R., Ryall R. W.* The acetylcholine receptors of Renshaw cells. — *Exp. Brain Res.*, 1966, 2, 66—80.

31. *Cuthbert A. W., Young J. M.* The number of muscarinic receptors in chick amnion muscle. — *Br. J. Pharmacol.*, 1973, 49, 498—505.
32. *Dale H. H.* The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1914, 6, 147—190.
33. *Dale H. H.* Acetylcholine as a chemical transmitter of the effects of nerve impulses. — *J. Mt. Sinai Hosp.*, 1938, 4, 401—429.
34. *del Castillo J., Katz B.* Production of membrane potential changes in the frog's heart by inhibitory nerve impulses. — *Nature*, 1955, 175—1035.
35. *Devine C. E., Somlyo A. V., Somlyo A. P.* Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. — *J. Cell Biol.*, 1972, 52, 690—718.
36. *Durbin R. P., Jenkinson D. H.* The effect of carbachol on the permeability of depolarized smooth muscle to inorganic ions. — *J. Physiol.*, 1961, 157, 74—89.
37. *Edman K. A. P., Schild H. O.* The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. — *J. Physiol.*, 1962, 161, 424—441.
38. *Fatt P., Katz B.* An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. — *J. Physiol.*, 1951, 115, 320—369.
39. *Fewtrell C. M. S.* The labelling and isolation of neuroreceptors. — *Neuroscience*, 1976, 1, 249—273.
40. *Fisher A., Weinstock M., Gitter S., Cohen S.* A new probe for heterogeneity in muscarinic receptors: 2-methyl-spiro-(1,3 dioxolane-4,3') quinuclidine. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1976, 37, 329—338.
41. *Foster M., Langley J. N.* *A Course of Elementary Practical Philosophy.* Macmillan, London, 1880.
42. *Furness J. B.* An electrophysiological study of the innervation of the smooth muscle of the colon. — *J. Physiol.*, 1969, 205, 549—562.
43. *Gardner R. M., Allen D. O.* Regulation of cyclin nucleotide levels and glycogen phosphorylase activity by acetylcholine and apinephrine in perfused rat hearts. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, 198, 412—419.
44. *Gaskell W. H.* On the innervation of the heart, with especial reference to the heart of the tortoise. — *J. Physiol.*, 1883, 4, 43—127.
45. *George W. J., Polson J. B., O'Toole J. B., Goldberg N. D.* Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 66, 398—403.
46. *Giles W., Noble S. J.* Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. — *J. Physiol.*, 1976, 261, 103—123.
47. *Green R. D., Dale M. M., Haylett D. G.* Effects of adrenergic amines on the membrane potential of guinea-pig liver parenchymal cells in short term tissue culture. — *Experientia*, 1972, 28, 1073—1074.
48. *Greengard P.* Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. — *Nature*, 1976, 260, 101—108.
49. *Haefely W.* Muscarinic postsynaptic events in the cat superior cervical ganglion in situ. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1974, 281, 119—143.
50. *Harris A. J., Kuffler S. W., Dennis M. J.* Differential chemosensitivity of synaptic and extrasynaptic areas on the neuronal surface membrane in parasympathetic neurons of the frog, tested by microapplication of acetylcholine. — *Proc. R. Soc. B.*, 1971, 177, 541—553.
51. *Hedqvist P., Von Euler U. S.* Inhibition by  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors of the twitch response to transmural stimulation in the guinea-pig vas deferens. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1977, 40, 153—162.
52. *Hiley C. R., Burgen A. S. V.* The distribution of muscarinic receptor sites in the nervous system of the dog. — *J. Neurochem.*, 1974, 22, 159—162.
53. *Hill-Smith I., Purves R. D.* Ionophoretic application of catecholamines to myocardial cells. — *J. Physiol.*, 1977, 269, 82—83P.
54. *Horn A. S.* Structure-activity relations for neurotransmitter receptor agonists. — In: *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 2, edited by L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. H. Snyder, 1975, pp. 179—243. Plenum Press, New York.

55. *Hubbard J. I., Schmidt R. F.* An electrophysiological investigation of mammalian motor nerve terminals. — *J. Physiol.*, 1963, 166, 145—167.
56. *Ignarro L. J., George W. J.* Hormonal control of lysosomal enzyme release from human neutrophils: Elevation of cyclic nucleotide levels by autonomic neurohormones. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2027—2031.
57. *Ikemoto Y., Goto M.* Effects of ACh on slow inward current and tension components of the bullfrog atrium. — *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1977, 9, 313—326.
58. *Ito Y., Kuriyama H.* Membrane properties and inhibitory innervation of the circular muscle cells of guinea-pig caecum. — *J. Physiol.*, 1973, 231, 455—470.
59. *Jafferji S. S., Mitchell R. H.* Muscarinic cholinergic stimulation of phosphatidylinositol turnover in the longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. — *Biochem. J.*, 1976, 154, 653—658.
60. *Katz B., Miledi R.* The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. — *Proc. R. Soc. B.*, 1965, 161, 483—495.
61. *Kebabian J. W., Bloom F. E., Steiner A. L., Greengard P.* Neurotransmitters increase cyclic nucleotides in postganglionic neurons: Immunocytochemical demonstration. — *Science*, 1975, 190, 157—159.
62. *Kebabian J. W., Steiner A. L., Greengard P.* Muscarinic cholinergic regulation of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in autonomic ganglia: Possible role in synaptic transmission. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975, 193, 474—488.
63. *Koelle G. B.* Neurohumoral transmission and the autonomic nervous system. — In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. by L. S. Goodman, A. Gilman, 1970, pp. 402—441. Macmillan Company, New York.
64. *Krnjevic K.* Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. — *Physiol. Rev.*, 1974, 54, 418—540.
65. *Krnjevic K., Pumain R., Renaud L.* The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. — *J. Physiol.*, 1971, 215, 247—268.
66. *Krnjevic K., Puil E., Werman R.* Is cyclic guanosine monophosphate the internal "second messenger" for cholinergic actions on central neurons? — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1976, 54, 172—176.
67. *Kuba K., Koketsu K.* Ionic mechanism of the slow excitatory postsynaptic potential in bullfrog sympathetic ganglion cells. — *Brain Res.*, 1974, 81, 338—342.
68. *Kuffler S. W., Yoshikami D.* The distribution of acetylcholine sensitivity at the post-synaptic membrane of vertebrate skeletal twitch muscles: Iontophoretic mapping in the micron range. — *J. Physiol.*, 1975, 244, 703—730.
69. *Kuhar M. J., Yamamura H. I.* Light autoradiographic localisation of cholinergic muscarinic receptors in rat brain by specific binding of a potent antagonist. — *Nature*, 1975, 253, 560—561.
70. *Kuo J. F., Lee T. P., Reyes P. L., Walton K. G., Donnelly T. E., Greengard P.* Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. — *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 16—22.
71. *Kuriyama H.* Electrophysiological observations on the motor innervation of the smooth muscle cells in the guinea-pig vas deferens. — *J. Physiol.*, 1963, 169, 213—228.
72. *Lane M. A., Sastre A., Salpeter M. M.* Cholinergic and adrenergic receptors on mouse cardiocytes in vitro. — *Dev. Biol.*, 1977, 57, 254—269.
73. *Martinez J. R., Quissell D. O.* Potassium release from rat submaxillary gland in vitro. II. Induction by parasympathomimetic secretagogues. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, 199, 519—525.
74. *Mitchell R. H.* Inositol phospholipids and cell surface receptor function. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1975, 415, 81—147.
75. *Nastuk W. L., Manthey A. A., Gissen A. J.* Activation and inactivation of postjunctional membrane receptors of frog skeletal muscle. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1966, 137, 999—1014.
76. *Nawroth H.* Cyclic AMP and cyclic GMP may play opposing roles in

- influencing force of contraction in mammalian myocardium. — *Nature*, 1976, 262, 509—511.
77. *Nawrath H.* Does cyclic GMP mediate the negative inotropic effect of acetylcholine in the heart? — *Nature*, 1977, 267, 72—74.
  78. *Nishiyama A., Petersen O. H.* Pancreatic acinar cells: Ionic dependence of acetylcholine-induced membrane potential and resistance change. — *J. Physiol.*, 1975, 244, 431—465.
  79. *Petersen O. H.* Electrophysiology of mammalian gland cells. — *Physiol. Rev.*, 1976, 56, 535—577.
  80. *Purves R. D.* Muscarinic excitation: a microelectrophoretic study on cultured smooth muscle cells. — *Br. J. Pharmacol.*, 1974, 52, 77—86.
  81. *Purves R. D.* Function of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. — *Nature*, 1976, 261, 149—151.
  82. *Purves R. D.* Current flow and potential in a three-dimensional syncytium. — *J. Theor. Biol.*, 1976, 60, 147—162.
  83. *Putney J. W.* Stimulation of  $^{45}\text{Ca}$  influx in rat parotid gland by carbachol. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, 199, 526—537.
  84. *Rang H. P.* Acetylcholine receptors. — *Quart. Rev. Biophys.*, 1975, 7, 283—399.
  85. *Richelson E.* Antipsychotics block muscarinic acetylcholine receptor mediated cyclic GMP formation in cultured mouse neuroblastoma cells. — *Nature*, 1977, 266, 371—373.
  86. *Rotter A., Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Field P. M., Raisman G.* Axotomy causes loss of muscarinic receptors and loss of synaptic contacts in the hypoglossal nucleus. — *Nature*, 1977, 266, 734—735.
  87. *Ryall R. W., Haas H. L.* On the physiological significance of muscarinic receptors on Renshaw cells: A hypothesis. In: *Cholinergic Mechanisms*, edited by P. G. Waser, 1975, pp. 335—341. Raven Press, New York.
  88. *Schulman J. A., Weight F. F.* Synaptic transmission: Long-lasting potentiation by a postsynaptic mechanism. — *Science*, 1976, 194, 1437—1439.
  89. *Schultz G., Hardman J. G.* Regulation of cyclic GMP levels in the ductus deferens of the rat. — *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1975, 5, 339—351.
  90. *Schultz K.-D., Schultz K., Schultz G.* Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. — *Nature*, 1977, 265, 750—751.
  91. *Steinbach J. H., Stevens C. F.* Neuromuscular transmission. In: *Frog Neurobiology. A Handbook* edited by R. Llinás, W. Precht, 1976, pp. 33—92. Springer Verlag, Berlin.
  92. *Stone T. W., Taylor D. A.* Microiontophoretic studies of the effects of cyclic nucleotides on excitability of neurones in the rat cerebral cortex. — *J. Physiol.*, 1977, 266, 523—543.
  93. *Sutherland E. W., Robison G. A., Butcher R. W.* Some aspects of the biological role of adenoside 3',5'-monophosphate (cyclic AMP). — *Circulation*, 1968, 37, 279—306.
  94. *Takeuchi A., Takeuchi N.* On the permeability of the endplate membrane during the action of the transmitter. — *J. Physiol.*, 1960, 154, 52—67.
  95. *Ten Eick R., Nawrath H., McDonald T. F., Trautwein W.* On the mechanism of the negative inotropic effect of acetylcholine. — *Pflügers Arch.*, 1976, 361, 207—213.
  96. *Tosaka T., Chichibu S., Libet B.* Intracellular analysis of slow inhibitory and excitatory postsynaptic potentials in sympathetic ganglia of the frog. — *J. Neurophysiol.*, 1968, 31, 396—409.
  97. *Trautwein W., Kuffler S. W., Edwards C.* Changes in membrane characteristics of heart muscle during inhibition. — *J. Gen. Physiol.*, 1956, 40, 135—145.
  98. *Trautwein W., Trube G.* Negative inotropic effect of cyclic GMP in cardiac fiber fragments. — *Pflüg. Arch.*, 1976, 366, 293—295.
  99. *Volle R. L.* *Muscarinic and Nicotinic Stimulant Actions at Autonomic Ganglia.* Pergamon Press, Oxford, 1966.
  100. *Yamamura H. I., Snyder S. H.* Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum with  $^3\text{H}$ -quinuclidinyl benzilate. — *Mol. Pharmacol.*, 1974, 10, 861—867.

## ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА ВЫХОД ФОСФАТА ИЗ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН

Р. В. ШТРАУБ, ДЖ. ФЕРРЕРО, Р. ДЖИРОУНЕК, М. РУИЛЛЕР,  
А. САЛАМИН

(R. W. STRAUB, J. FERRERO, P. JIROUNEK, M. ROUILLER, A. SALAMIN)

*Отдел фармакологии, Медицинская школа, 1211, Женева 4, Швейцария*

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение транспорта неорганического фосфата в нервных волокнах млекопитающих показало, что вход и выход ортофосфата представляют намного более медленные процессы, чем метаболические превращения фосфата в цепи основных водорастворимых соединений [2].

Вход ортофосфата может быть разделен на линейную и насыщаемую компоненты. Насыщаемый вход зависит от присутствия мембранного натрия, ионы которого активируют этот процесс и повышают его скорость [1, 10]. Эксперименты по выходу фосфата показали, что в находящемся в покое нерве существует постоянный выход неорганического фосфата; при этом выход органического фосфата характеризуется гораздо меньшей величиной. При выходе фосфата также присутствуют две компоненты — зависящая от натрия, которая активируется при наличии внешнего натрия и фосфата и требует наличия внутриклеточных натрия и фосфата, и независимая от натрия [7]. Таким образом, значительная часть входа и выхода неорганического фосфата осуществляется с помощью зависимой от натрия транспортной системы. Эта система переносит также арсенат, однако отличается от митохондриального переносчика фосфата и неспособна к транспорту дикарбоновых кислот.

С другой стороны, часть входа и выхода фосфата не опосредована зависимой от натрия системой. Эта часть входа линейно зависит от концентрации наружного фосфата: она относительно невелика и при 0,2 мМ концентрации наружного фосфата, например, составляет около  $1/10$  общего входа [1]. Независимый от натрия выход относительно больше в растворе Локе и при 0,2 мМ концентрации фосфата составляет около  $1/3$  общего выхода; кроме того, он не зависит от концентрации наружного фосфата [7].

В процессе изучения потоков фосфата был обнаружен третий механизм выхода фосфата. Если заменить натрий в растворе Локе холином, то наблюдается массивный и быстрый выход меченого фосфата. Замена натрия литием такого эффекта не дает. Быстрый выход метки наблюдался также и при простом добавлении холина к раствору Локе; тот же эффект вызывало добавление относительно небольших количеств АХ и других холиноподобных соединений. Этот раздел посвящен детальному описанию указанных явлений.

## МЕТОДЫ

Потоки фосфата измеряли по ранее описанным методам [1, 2]. Для измерений входа фосфата лишенный оболочки блуждающий нерв кролика помещали в трубку, перфузируемую раствором Локе или этим раствором, содержащим меченый  $^{32}\text{P}$  фосфат. Трубку помещали перед окошком бета-счетчика, который регистрировал радиоактивность препарата и внеклеточной жидкости. Для измерений выхода фосфата препарат насыщали меченым фосфатом в течение 2 ч и затем промывали неактивным раствором Локе, после чего определяли радиоактивность собранных промывок. В конце эксперимента нерв удаляли, гомогенизировали и экстрагировали водорастворимые фосфаты.

Радиоактивность водного экстракта использовали как основу для расчета константы скорости, поскольку в предыдущих экспериментах было показано, что именно из этой фракции освобождается большая часть фосфата при промывании препарата.

Составы использованных растворов описаны [1, 2]. Все использованные растворы содержали 0,2 мМ ортофосфат; pH поддерживали равным 7,4.

Во всех случаях, за исключением особо оговоренных, температура была  $37^\circ\text{C}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Действие ацетилхолина

На рис. 19 показано влияние АХ на выход фосфата из блуждающего нерва кролика. Первоначальный выход фосфата был измерен в растворе Локе, затем добавляли 3 мМ АХ, после чего препарат вновь помещали в раствор Локе. Как видно из рис. 19, выход фосфата быстро возрастает после действия АХ, а затем все еще в присутствии АХ выход постепенно понижается до достижения постоянного значения, существовавшего до действия лекарства. Когда препарат вновь помещают в раствор

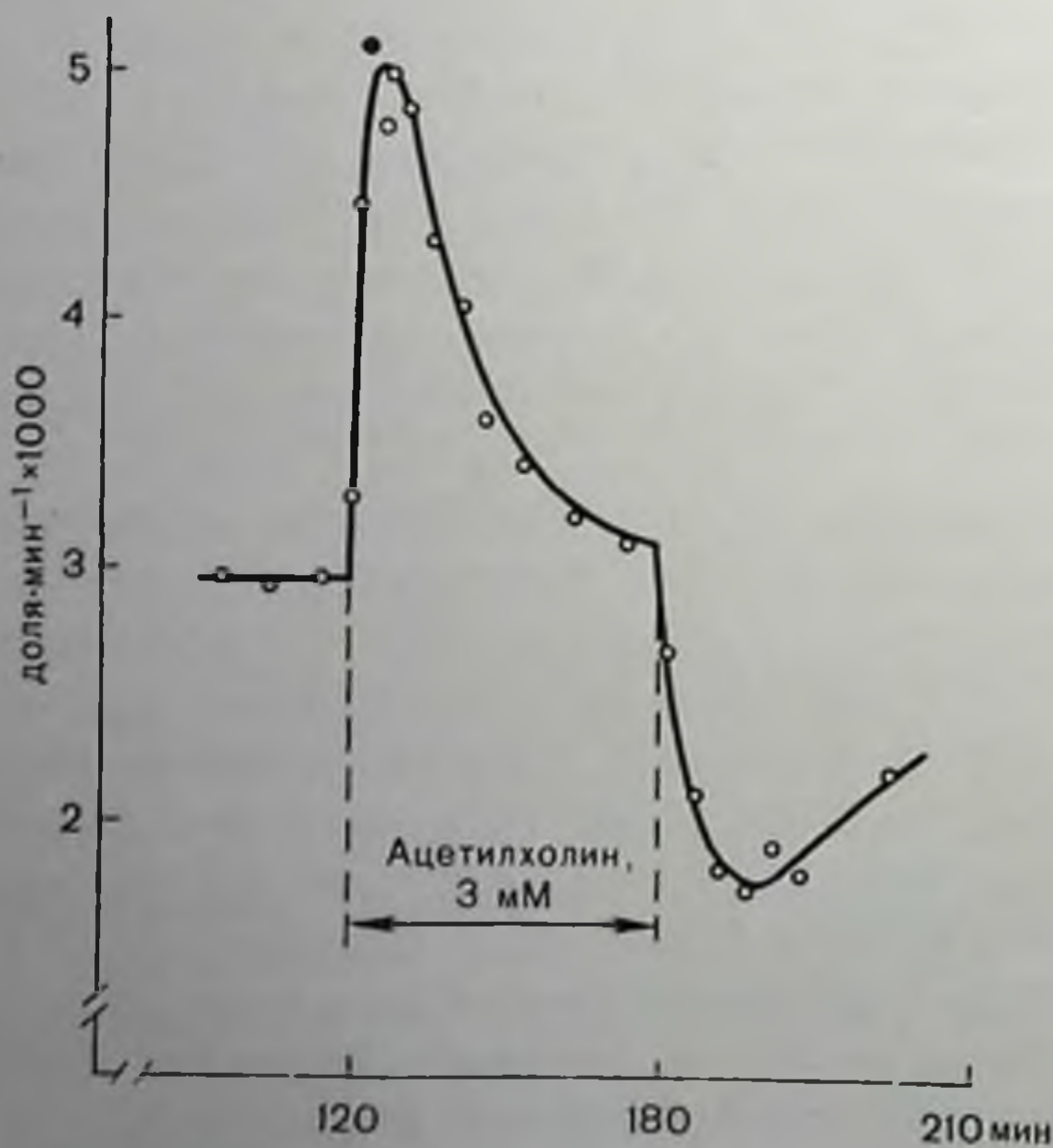


Рис. 19. Влияние ацетилхолина на выход фосфата из блуждающего нерва кролика.

По оси ординат — доли потери фосфата при инкубации в растворе Локе, при действии ацетилхолина и после возвращения образца в раствор Локе; по оси абсцисс — время от начала промывания. Температура  $37^\circ\text{C}$ .



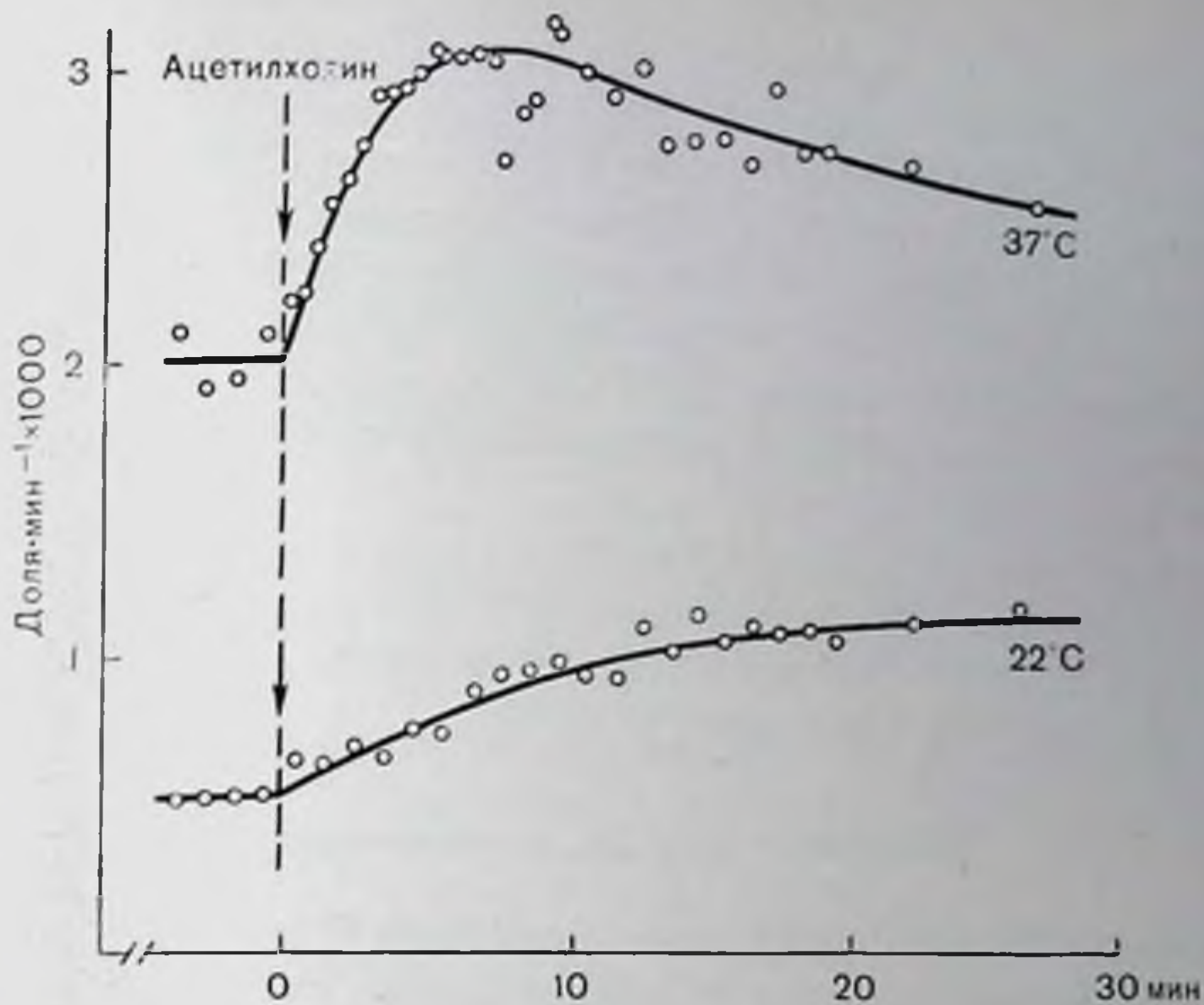


Рис. 20. Действие ацетилхолина при различных температурах.

По оси ординат — доля потери фосфата при инкубации в растворе Локе и после действия 1,7 мМ ацетилхолина; по оси абсцисс — время от начала действия ацетилхолина. Препараты предварительно промывали неактивным раствором Локе в течение 150 мин (верхняя кривая) и 180 минут (нижняя кривая).

Локе, выход сначала понижается, но затем медленно повышается до нормальной величины.

На других препаратах эффект АХ был изучен более подробно. Развитие эффекта происходило в течение короткого времени (рис. 20): для начального участка соответствующая временная

Т а б л и ц а 3. Влияние ацетилхолина на выход фосфата

Концентрация АХ, мМ	Константа скорости до добавления АХ, а, мин <sup>-1</sup>	Пик константы скорости, b, мин <sup>-1</sup>	b/a	Время достижения пика, мин	Время достижения исходного значения, мин
0,1	2,9	2,9	1	—	—
1,0	2,46	3,32	1,35	10	26
1,0	2,36	3,24	1,37	12,5	13,7
1,7	3,0	4,6	1,53	5	18
1,7	2,35	3,85	1,64	10	20,2
2,0*	2,0	3,15	1,58	10	31,7
3,0	2,95	5,05	1,71	5	14,3
5,0	2,35	4,8	2,04	7,5	31,7
среднее				8,6	22,2
2,0* **	0,5	1,1	2,2	715	
3,0**	0,5	1,3	2,6	740	

Примечание. Пробы отбирали каждые 5 мин за исключением случаев, отмеченных одной звездочкой, в которых пробы отбирали через 0,5 мин. Температура 37°C за исключением случаев, отмеченных двумя звездочками, когда эксперименты проводили при 22 и 20,5°C соответственно.

константа при 37° С составляет 2½ мин. Понижение температуры замедляет развитие эффекта, временная константа повышается примерно до 8 мин при 22° С и до 13 мин при 20,5° С. Максимальные значения эффектов и снижение повышенного выхода, определенные в ряде экспериментов, приведены в табл. 3.

Выход фосфата после возвращения образца в раствор Локе изучался менее систематически. Приближенное значение временной константы для процесса возвращения выхода к нормальному значению составляет 15 мин.

Предварительные эксперименты показали, что АХ влияет также на вход фосфата. Действие 1—3 мМ АХ приводит к заметному уменьшению захвата фосфата; при концентрации АХ 3 мМ вход фосфата понижается примерно на 50%.

### Действие других соединений

**Холиноподобные соединения.** Помимо АХ, и другие холиноподобные соединения также повышают выход фосфата; при этом в общем виде наблюдается та же картина, что и в случае АХ. Повышение осуществляется быстро, а после возвращения препарата в раствор Локе происходит быстрое понижение выхода фосфата. В табл. 4 приведены данные, характеризующие ацетилхолиноподобное действие холина, метахолина и карбахола.

Таблица 4. Влияние различных соединений на выход фосфата

Соединение	Концентрация, мМ	Константа скорости до добавления АХ, а. мин <sup>-1</sup>	Пик константы скорости, в, мин <sup>-1</sup>	b/a	Время достижения пика, мин	Время возвращения к норме, мин
Холин	10	2,4	2,98	1,23	7,5	15,9
Метахолин	1	2,6	3,4	1,31	10	10,8
Карбахол	1	2,75	2,84	1,03	7,5	—
d-Тубокурарин	0,1	2,5	2,2	0,88	60	—
»	1,5	2,3	2,05	0,89	60	—
»	10	2,3	6,75	2,93	15	—
Тетраэтиламмоний	15	2,18	3,0	1,38	30	—
Гексаметоний	0,1	2,35	2,2	0,91	60	—
Атропин	1	3,35	2,4	0,72	5	—
»	1	1,8	1,15	0,63	30	—
Диизопропилфторфосфат	0,1	1,8	2,03	1,13	15	—
Гемихолиний	2	1,8	2,05	1,14	12,5	—
NH <sub>4</sub> Cl	3	2,3	3,5	1,52	15	42
»	10	1,35	3,0	2,22	25	52
Ацетат	3	2,2	2,95	1,34	5	87
Трис	20	2,7	3,2	1,19	7,5	11,5

**Холинергические ингибиторы.** Холинергические ингибиторы или вызывают повышение выхода фосфата, подобно АХ, или же

приводят к понижению выхода. В высоких концентрациях кураре и тетраэтиламмоний вызывают повышение выхода, тогда как действие атропина ведет к его понижению.

**Ингибиторы холинэстеразы.** При действии диизопропилфторфосфата обнаружено повышение выхода фосфата.

**Прочие соединения.** Гемиколлинй, трис, хлорид аммония и ацетат повышают выход фосфата.

### Действие ацетилхолина в присутствии других соединений

Действие АХ в присутствии других соединений изучалось в ряде экспериментов. Как следует из табл. 5, действие АХ мало-

Таблица 5. Действие ацетилхолина в присутствии других соединений

Соединение	Концентрация, мМ	Концентрация АХ, мМ	Константа скорости до добавления АХ, а. мин <sup>-1</sup>	Пик константы скорости, в, мин <sup>-1</sup>	в/а	Время достижения пика, мин	Время возвращения к исходному состоянию, мин
d-Тубокурарин	0,1	1,7	2,2	3,65	1,66	7,5	23,1
»	1,5	1,7	2,05	3,15	1,54	7,5	18,8
»	10	1,7	6,1	12,2	2,0	7,5	41,1
Тетраэтиламмоний	15	1,7	2,9	3,36	1,16	10	19,5
Атропин	1	1	2,7	4,25	1,57	12,5	14,4
»	1	1	1,24	3,82	3,08	10	10
Гексаметоний	0,1	1,7	2,15	3,6	1,67	10	20,2
Диизопропилфторфосфат	0,1	2,0	2,05	2,75	1,38	10	16,6
Трис	20	1,7	2,44	3,04	1,25	10	15,4
Среднее					1,70	9,4	19,9
Холин-Локе	154	1,7	2,5	2,6	1,04	7,5	—
Трис-Локе	154	1,7	0,75	0,75	1,0	—	—
»	154	3	0,64	0,75	1,17	12,5	—
Среднее					1,07	10	
Li—Локе	154	1,7	1,1	1,85	1,68	15	49,1

чувствительно к присутствию кураре, атропина и диизопропилфторфосфата; в одном из экспериментов тетраэтиламмоний понизил эффективность действия АХ. Как холин, так и трис понижают эффективность АХ, если их используют в больших концентрациях для замены натрия. В присутствии лития эффект АХ остается постоянным. Антагонизм между АХ и холином наблюдается и в случае, если первым применяют АХ (1,7 мМ); последующее добавление 10 мМ холина больше уже не вызывает повышения выхода фосфата.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показывают, что АХ вызывает быстрое высвобождение радиоактивно меченого фосфата и что возвращение образца в нормальный раствор Локе ведет к уменьшению выхода фосфата с последующим медленным восстановлением нормального уровня выхода фосфата. Такое поведение согласуется с его высвобождением из ограниченного пространства, которое пополняется меченым фосфатом в отсутствие АХ. Поскольку основные внутриклеточные растворимые фосфаты находятся между собой в изотопном равновесии [2], это пространство должно существовать наряду с основным компартментом, высвобождение из параллельного компартмента, например, внутриклеточного соединения или из небольшой группы мышечных волокон находилось бы в необъяснимом противоречии с названными наблюдениями. Размеры компартмента могут быть определены из кривой выхода, регистрируемой после действия АХ. Экстраполяция экспоненциального понижения скорости к моменту нанесения АХ показывает, что этот компартмент, по данным шести независимых определений, содержит 10,7% водорастворимого фосфата. Размер компартмента не зависит от концентрации АХ. Его можно определить из скорости повторного заполнения после возвращения в раствор Локе. Из сравнения этих данных с величиной нормального стационарного выхода следует, что изучаемый компартмент составляет около 6% основного.

По-видимому, АХ высвобождает фосфат с поверхности нервных волокон. Поверхностная локализация пространства, содержащего меченый фосфат, была установлена в результате экспериментов по входу фосфата на полосатых мышцах [6] и на волокнах блуждающего нерва [2]. В блуждающем нерве количество фосфата, задерживающегося в этом локализованном на поверхности объеме, пропорционально концентрации наружного фосфата [2]; при обычно используемой в экспериментах 0,2 мМ концентрации фосфата этот объем содержит около 1% общего водорастворимого фосфата.

Действие АХ на потоки фосфата отличается, по-видимому, от повышенного высвобождения тиамин и тиаминмонофосфата, вызываемого в мембранах нервов под действием некоторых лекарств [8]. Обсуждаемый эффект, однако, может быть связан с действием АХ и подобных соединений на потенциал действия и потенциал покоя в блуждающем нерве [3—5]. В обоих случаях для проявления эффектов действия АХ на потоки фосфатов и потенциалы требуется относительно высокая концентрация АХ, которая намного превосходит концентрацию АХ, требуемую для активации холинергических рецепторов. Кроме того, действие АХ на движение фосфата не согласуется с фармакологией холинергических рецепторов и влияние АХ на потенциалы, хотя оно и было идентифицировано как действие через никотиновые рецепторы, не полностью соответствует известным свойствам этих рецепторных

центров. Отсюда может возникнуть предположение, не является ли причиной высвобождения фосфатов деполяризация, вызванная действием АХ. Однако по нескольким причинам эту возможность следует исключить. Во-первых, вызываемая АХ деполяризация представляет собой постоянный, а не быстротечный феномен [5]. Во-вторых, деполяризация должна скорее ограничить выход аниона фосфата, чем увеличить его. Действие АХ через зависимую от натрия систему на положительно заряженный комплекс также исключается, поскольку эффект АХ сохраняется и в растворе Ли — Локе, где зависимый от натрия выход резко понижается. Еще одним различием является тот факт, что атропин устраняет деполяризацию, но не оказывает действия на вызываемый АХ выход фосфата.

Armelt и Ritchie [5] обнаружили электрофизиологическое доказательство того, что повышенный вход кальция может быть причиной вызываемой АХ деполяризации, а эксперименты Keynes и Ritchie [9] с радиоактивными маркерами продемонстрировали незначительное увеличение захвата кальция и выхода фосфата. Эти результаты могут иметь отношение к обсуждаемым явлениям.

Поскольку между кальцием и движением фосфата существует тесная взаимосвязь указанная проблема нуждается в дальнейшем изучении.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anner B., Ferrero J., Jirounek P., Jones G. J., Salamin A., Straub R. W. Sodium-dependent influx of orthophosphate in mammalian non-myelinated nerve. — *J. Physiol.*, 260, 667—686, 1976.
2. Anner B., Ferrero J., Jirounek P., Straub R. W. Uptake of orthophosphate by rabbit vagus nerve fibres. — *J. Physiol.*, 1975, 247, 759—771.
3. Armelt C. J., Ritchie J. M. The action of acetylcholine on conduction in mammalian non-myelinated fibres and its prevention by an anticholinesterase. — *J. Physiol.*, 1960, 152, 141—158.
4. Armelt C. J., Ritchie J. M. The action of acetylcholine and some related substances on conduction in mammalian non-myelinated nerve fibres. — *J. Physiol.*, 1961, 155, 372—384.
5. Armelt C. J., Ritchie J. M. The ionic requirements for the action of acetylcholine on conduction in mammalian non-myelinated nerve fibres. — *J. Physiol.*, 1963, 155, 372—384.
6. Causey G., Harris E. J. The uptake and loss of phosphate by frog muscle. — *Biochem. J.*, 1951, 49, 176—183.
7. Ferrero J., Jirounek P., Rouiller M., Salamin A., Straub R. W. Efflux of inorganic phosphate from rabbit vagus in Locke and Na-free Locke. — *J. Physiol.*, 1976, 263, 215—216P.
8. Itokawa Y., Cooper J. R. Ion movements and thamine. II. The release of the vitamin from membrane fragments. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 196, 274—284.
9. Keynes R. D., Ritchie J. M. The movements of labelled ions in mammalian non-myelinated nerve fibres. — *J. Physiol.*, 1965, 179, 333—367.
10. Straub R. W., Ferrero J., Jirounek P., Rouiller M., Salamin A. Sodium-dependent transport of orthophosphate in nerve fibres. — *Adv. Exp. Biol. Med.*, 1977, 81, 333—344.

## ВЛИЯНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ НА ИОННУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Д. Х. ДЖЕНКИНСОН, Д. ДЖ. ХЕЙЛЕТТ, К. КОЛЛЕР  
(D. H. JENKINSON, D. G. HAYLETT, K. KOLLER)

*Отдел фармакологии, Университетский колледж Лондона,  
Лондон WC1E6BT, Англия*

Первые попытки обнаружить действие катехоламинов на ионную проницаемость клеточных мембран дали отрицательные результаты. Так, детальные эксперименты Stafford [94] показали, что эпинефрин и изопреналин не оказывают влияния на обмен калия в изолированном, находящемся в состоянии покоя левом предсердии кролика. Не было также выявлено действия эпинефрина на выход калия из гладких мышц кишечника [9]. Тем не менее в настоящее время известно, что в клетках обеих указанных выше тканей, как и во многих других клетках, происходит увеличение проницаемости. Установлено, что в сердце катехоламины оказывают действие в основном не на находящуюся в покое мембрану, а на зависящую от времени и напряжения проницаемость, соответствующую разным фазам потенциала действия. Исследования методом фиксации потенциала показали, что эти изменения носят сложный характер и различаются для определенных участков сердечной мышцы; они обладают также видовым различием [10, 79, 100]. Поскольку в настоящем разделе рассматриваются преимущественно эффекты, связанные с проницаемостью клеток в состоянии покоя, указанные результаты не будут обсуждаться подробно; следует лишь отметить, что анализ механизма влияния агентов, изменяющих потенциал действия сердечной или другой электрически возбудимой ткани, как правило, более сложен, чем демонстрация изменений в проницаемости покоящейся клетки. Хотя и представляется вполне вероятным, что некоторые из аспектов воздействия катехоламинов на центральную нервную систему могут служить подтверждением роли изменений проводимости в потенциалах действия нейронов, проблема фиксации потенциала этих нейронов *in situ* только сейчас становится реально разрешимой.

Менее сложные методы могут быть использованы для выяснения влияния катехоламинов на мембранную проницаемость периферических клеток в состоянии покоя. Одним из очевидных подходов представляется наблюдение за трансмембранными потоками радиоактивных изотопов интересующих нас неорганических ионов, а другим — изучение изменений мембранных потенциала и проводимости. Каждый из подходов имеет свои преимущества и недостатки [29, 30]. Возможности этих подходов хорошо показаны в первых исследованиях действия катехоламинов на проницаемость мембраны, находящейся в состоянии покоя. Эксперименты были выполнены на гладкой мышце кишечника *taenia coli* морской свинки. Эта ткань под действием эпинефрина и норэпинефрина расслабляется и, как было обнаружено, наблюдаемое рас-

слабление связано с повышением мембранного потенциала и с понижением частоты потенциала действия [41].

Было предложено несколько возможных объяснений этого действия катехоламинов на мембранный потенциал, в том числе повышение активности электрогенного натриевого насоса, понижение проницаемости мембраны для натрия и повышение — для калия. Последнее объяснение может показаться противоречащим отсутствию влияния эpineфрина на выход калия. Однако как повышение мембранного потенциала, так и понижение потенциала действия должно стремиться уменьшить выход калия, что может замаскировать повышение выхода, возникающее вследствие увеличения мембранной проницаемости для калия. Возможным радикальным методом устранения этой трудности может послужить снятие мембранного потенциала благодаря использованию в инкубационном растворе ионов калия вместо ионов натрия. В таких условиях Jenkinson и Morton [50—52] обнаружили, что норэpineфрин повышает вход и выход  $^{24}\text{K}$ , т. е. хотя бы часть ингибиторного действия норэpineфрина и эpineфрина может объясняться повышением проницаемости мембран для калия. К тому же выводу совершенно независимо привели электрофизиологические эксперименты, выполненные на той же ткани. Вслед за первыми работами Shuba [90], Bogach и Klevets [8] продемонстрировали, что повышение мембранного потенциала, вызванное эpineфрином, связано с увеличением проводимости за счет ионов калия. Аналогичные результаты были получены Bülbring и Tomita [15], Ohashi [70], которые показали, что повышение проводимости происходит за счет как хлора, так и ионов калия. Полученные Као и соавт. [47, 53] результаты, использованные ими против идеи повышения калиевой проводимости, были подвергнуты сомнению со стороны таких ученых, как Tomita, Sakamoto и Ohba [99], Shuba и соавт. [96], которые применили в своих экспериментах технику фиксации потенциала [16].

Прежде чем перейти к рассмотрению аналогичных экспериментов на других тканях, полезно рассмотреть, какой из двух основных классов адренергических рецепторов ( $\alpha$  и  $\beta$ , по терминологии Ahlquist [1]) вовлекается в реализацию влияния катехоламинов на проницаемость мембран. Независимо от самостоятельного фармакологического интереса, связанного с классификацией и интерпретацией различий в рецепторах, определение типа рецептора, ответственного за данный эффект, поможет выяснить возможный механизм интересующего нас эффекта. Так, например, активация  $\beta$ -рецепторов для катехоламинов (но не  $\alpha$ -рецепторов) приводит к повышению активности аденилатциклазы, а значит и количества цАМФ в тканях, содержащих эти рецепторы; исключений при этом практически не наблюдается. Правда, иногда сообщалось о понижении уровня цАМФ после активации  $\alpha$ -рецепторов [101], тогда как повышение его уровня было описано для коры головного мозга крыс и морских свинок [73, 84, 91]. Сложное строение этой ткани оставляет открытым вопрос о возмож-



Рис. 21, А — Сравнение эффектов (+)-изопреналина и (-)-норэпинефрина (норадреналина) каждого в концентрации около 1 мкМ на скорость потери меченого калия продольных гладких мышц кишечника (*taenia coli* морской свинки), инкубируемых в богатом калием растворе. Норэпинефрин, который активировал и  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторы, более эффективен, чем селективный  $\beta$ -агонист изопреналин. Этот результат указывает, что именно  $\alpha$ -рецепторы определяют изменение проницаемости, вызывающее повышенный выход  $^{42}\text{K}$ .

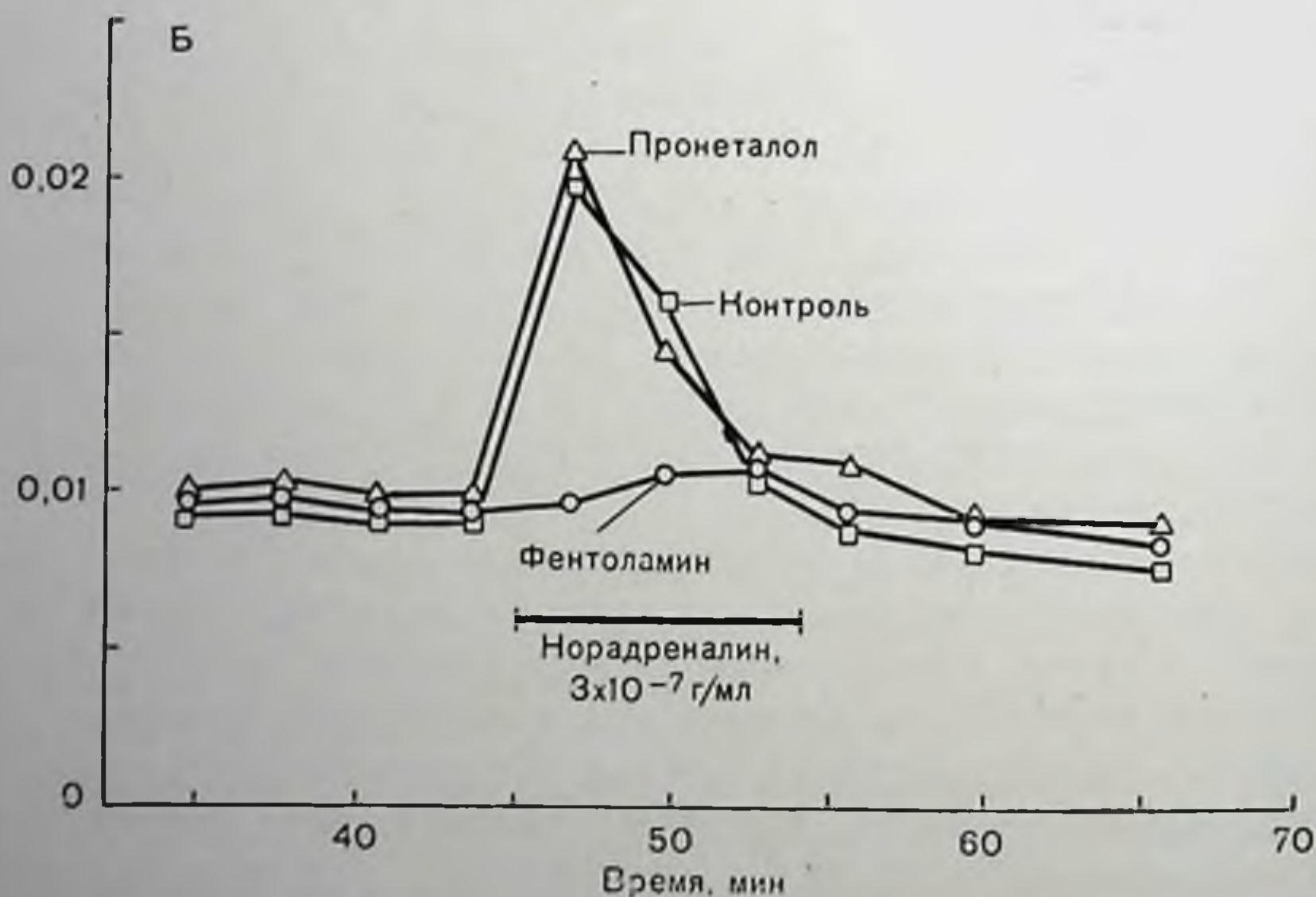


Рис. 21, Б. В соответствии с приведенным объяснением находятся данные, показывающие, что при действии одинаковых концентраций норэпинефрина на три полоски ткани одной и той же морской свинки реакция ткани резко понижается в присутствии 320 нМ  $\alpha$ -блокатора фентоламина, но не изменяется в присутствии 380 нМ  $\beta$ -блокатора пронеталола [51].

ности непрямого развития эффекта. Тормозное действие активации  $\alpha$ -рецепторов на повышение уровня цАМФ, вызванное другими соединениями, также отмечалось в ряде работ. Так, например,  $\alpha$ -рецепторы понижают увеличение уровня цАМФ, вызывае-



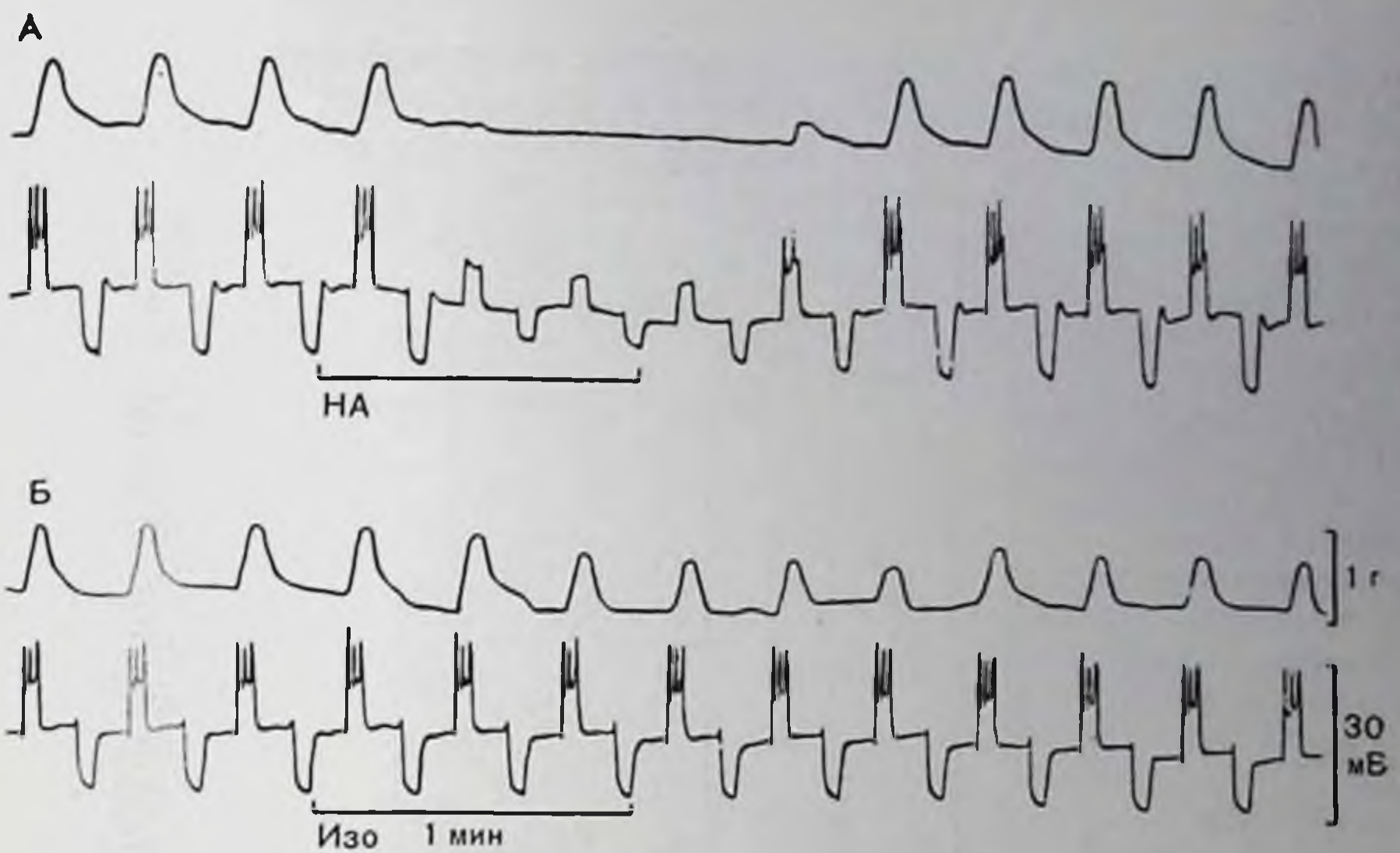


Рис. 22. Влияние норэпинефрина (НА, 0,8 мкМ) и изопреналина (Изо, 1 мкМ) на механическую (А и Б — верхняя кривая) и электрическую (А и Б — нижняя кривая) активность полоски *taenia coli* морской свинки. Импульсы постоянного тока переменной полярности длительностью 3 с прикладывали каждые 10 с. Норэпинефрин вызывает гиперполяризацию мембраны и повышает ее проводимость, что следует из понижения амплитуды напряжения, вызываемого импульсами постоянного тока. Деполяризованный ток уже не генерирует потенциалов действия и соответственно не вызывает механического ответа. В противоположность этому изопреналин понижает механический ответ, не изменяя электрических свойств мембраны. Эти данные находятся в соответствии с предположением, что действие катехоламинных рецепторов на проводимость мембраны опосредовано  $\alpha$ -рецепторами [12].

мого кортикотропином в жировой ткани [44]. Увеличение цАМФ вызывает определенные биохимические процессы, которые во многих тканях включают активацию фосфоорилазы и торможение гликогенсинтетазы, что в свою очередь повышает гликогенолиз. Таким образом, если выдвинутое ранее объяснение гиперполяризации гладкой мышцы под действием эпинефрина справедливо, т. е. оно действительно вызывается увеличением активности электрогенного натриевого насоса, вследствие повышенного гликогенолиза, можно полагать, что этот ответ медируется  $\beta$ -рецепторами. Однако исследования в области классификации рецепторов показывают, что это не так: скорее  $\alpha$ -, чем  $\beta$ -рецепторы вызывают гиперполяризацию за счет повышения проницаемости мембран. Некоторые подтверждения этого приведены на рис. 21 и 22, иллюстрирующих два уже упомянутых метода выявления изменений в проницаемости мембран. Методы идентификации рецепторов катехоламинов в этих экспериментах основаны на подходе Ahlquist [1]; обзоры, посвященные классификации адренергических рецепторов см. [27, 48 и 81]. Последние работы в этой области показали, что норэпинефрин ингибирует свое собственное высвобождение с адренергических нервных окончаний. Было высказано

Т а б л и ц а 6. Ткани, в которых  $\alpha$ -рецепторы могут изменять проводимость мембран, находящихся в состоянии покоя

Ткань	Метод	Изменение мембранного потенциала	Изменение проводимости (проницаемости)	Затрагиваемая ионная проводимость	Примечания	Источники
Гладкие мышцы						
<i>Caenia coli</i>	М		↑	$K^+$	Выраженное действие эстрогена	См. текст [14]
морской свинки	Э	↑	↑	$K^+, Cl^-$		
То же	Э	↓	↑	$Cl^-, K^+$		
Мышцы оболочки матки морской свинки						
<i>Vas deferens</i>	Э	↓	↑	$Na^+, K^+ (Ca^{2+})$	Низкий уровень $\alpha$ -стимуляции вызывает сокращение без изменений потенциала или проводимости	[62]
морской свинки	Э	↓	↑	$Na^+, Cl^-$		[64]
Сонная артерия кролика						
<i>Aposocygeus</i>	Э	↓	↑	$Na^+$ или $Cl^-$		[19]
крысы	М		↑	$Cl^-$		[103,
Воротная вена крысы	Э	↓	↑	$Cl^-, Na^+, Ca^{2+}$	Затрагиваются также медленные натриевые каналы механизма потенциала действия	104]
Воротная вена крысы	Э	↓	↓	$K^+$		[90,89]
Легочная артерия кролика	Э	↓	↓			
Мочеточник морской свинки	Э	(↓)	(↓)			
Невозбудимые ткани						
Печень морской свинки	Э, М.	↑	↑	$K^+$	Рецептор лучше называть $\alpha$ -подобным	[38—40]
Печень кролика	Э, М.	↑	↑	$K^+$	Повышается также выход Са (см. рис. 23)	[37]
Печень собаки	Э	↓	↑?	$Na^+, K^+?$	Гиперполяризуются $\beta$ -рецепторы	[60]
Адипозная ткань крысы (коричневая)	Э	↓	↑		Деполаризуются $\beta$ -рецепторы	[45,25]

Ткань	Метод	Изменение мембранного потенциала	Изменение проводимости (проницаемости)	Затрагиваемая ионная проводимость	Примечания	Источники
То же (белая)	М		(↑)?	K <sup>+</sup>	α-рецепторы вызывают быстрое временное повышение выхода <sup>42</sup> K, которое может указывать на повышение проницаемости калия	[74]
Саблевидные клетки слюнной железы мышей	Э	↑	↑	K <sup>+</sup>		[75], см. текст

Условные обозначения: Э — электрофизиологический, М — с использованием маркера.

предположение, что это пресинаптическое ингибирование опосредовано рецептором, хотя и подобным α-рецептору, но заметно отличающимся от постсинаптической его разновидности, на которой были выполнены все предыдущие эксперименты по изучению механизма действия α-рецепторов [61, 95, 96]. Связаны ли изменения в проницаемости с указанным пресинаптическим ингибированием, пока неясно.

В табл. 6 приведены результаты экспериментов, в которых была показана роль α-рецепторов в изменении ионной проницаемости. Этот список не является исчерпывающим, и подбор данных призван показать разнообразие тканей, в которых было обнаружено изменение проницаемости. Заслуживает внимания, что для некоторых гладких мышц была показана возможность понижения проницаемости мембран.

### ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ α-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

Существует мало прямых указаний на природу механизма, по которому осуществляется влияние α-рецепторов на проницаемость мембран. Одной из возможностей является повышение концентрации ионов кальция с внутренней стороны мембраны под действием α-рецепторов, что вызывает последующее изменение ее проницаемости. Доказательство влияния внутриклеточного кальция на ионную проницаемость мембран получено для нескольких видов клеток [7, 42, 102]. По-видимому, источники кальция в разных тканях различны. В артериальной гладкой мышце активация

$\alpha$ -рецепторов предположительно вызывает высвобождение кальция из его внутриклеточных хранилищ. Этот процесс ответствен за быструю начальную фазу сокращения в ответ на действие норэпинефрина. Следующая, медленная и зависящая от кальция фаза сокращения может, по-видимому, быть связана с повышением проницаемости для него мембраны, что позволяет большему количеству кальция войти внутрь мышечных волокон [22, 23].

Эффект торможения  $\alpha$ -рецепторов, находящихся в *taenia coli* морской свинки, также зависит от кальция. Это служит подтверждением предположения, что и в данном случае места действия кальция, опосредующего влияние  $\alpha$ -рецепторов на проницаемость мембраны для калия, находятся на внутренней ее стороне [17].

В некоторых других тканях большое количество кальция входит в клетки, по-видимому, с наружной стороны. Так, в околоушной железе крысы удаление наружного кальция быстро понижает эффективность  $\alpha$ -рецепторов в увеличении выхода калия, который и в этом случае, как полагают, связан с повышением проницаемости мембраны для калия [6, 86]. Этот факт и другие доказательства обобщены в комментариях Selinger, Eimerl и Schramm [87], которые высказывают мысль, что «рецептор эпинефрина выполняет, по-видимому, функцию ионофора, вводя  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клетки». И действительно, ответ на активацию  $\alpha$ -рецепторов этой ткани может быть незаметен при применении кальциевого ионофора А-23157. Однако недавно было выдвинуто предположение, что в повышении проницаемости мембран для калия может играть роль и высвобождение кальция из его внутриклеточных хранилищ [77, 78].

Эксперименты с меченым кальцием подтверждают предположение о том, что  $\alpha$ -рецепторы влияют на токи и внутриклеточное распределение его ионов. Deth и Van Breemen [22, 23] показали, что норэпинефрин вызывает небольшое увеличение входа  $^{45}\text{Ca}$  в артериальную мышцу и значительное, но быстрое увеличение его выхода. Обнаружено также [5], что активация  $\alpha$ -рецепторов вызывает вход и выход кальция в выделенных из печени крыс паренхимальных клетках; сильное влияние  $\alpha$ -агонистов на выход кальция из клеток на срезах печени кроликов и морских свинок описано Haylett [37]. Эти данные представлены на рис. 23, на котором показано также, что  $\beta$ -агонист изопренилин относительно малоэффективен в этом отношении. Было обнаружено значительное совпадение в возрастании выхода  $^{45}\text{Ca}$  и  $^{42}\text{K}$ , хотя для последнего возрастание выхода носит более скоротечный характер. Эти наблюдения (см. рис. 26) коррелируют с идеей об ответственности возрастания внутриклеточной концентрации иона кальция за увеличение проницаемости мембран для калия, хотя и нельзя сказать, что они однозначно подтверждают эту гипотезу.

На рис. 23 показано также, что вслед за активацией  $\alpha$ -рецепторов в ткани печени кроликов, крыс и морских свинок наблюдается возрастание высвобождения глюкозы. цАМФ не вовлечен в этот ответ [18, 72, 88], который может явиться дальнейшим

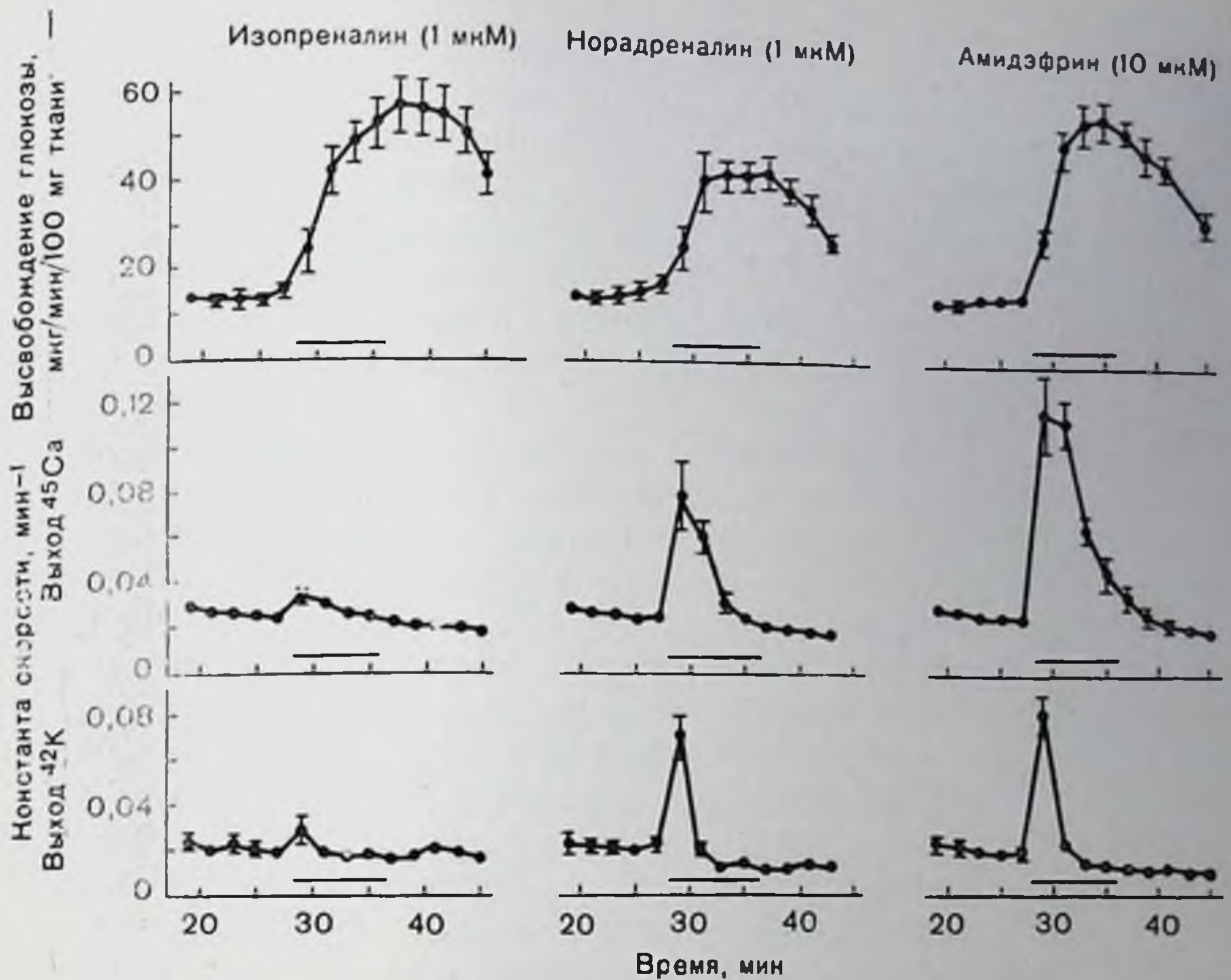


Рис. 23. Действие (—)-изопреналина, (—)-норэпинефрина (норадреналина) и (—)-амидэфрина (селективного  $\alpha$ -агониста) на одновременно измеренные выходы глюкозы,  $^{45}\text{Ca}$  и  $^{42}\text{K}$  из срезов печени кролика. Агонисты наносили в течение четырех последовательных 2-минутных периодов, которым соответствуют горизонтальные полоски на графиках. Каждая точка — среднее трех-четырёх измерений: ошибки указаны в тех случаях, когда они превосходят размер точки [37].

последствием постулированного ранее увеличения концентрации внутриклеточного кальция [18, 37].

Рассматривая механизм действия  $\alpha$ -рецепторов на клеточный кальций, Mitchell и соавт. предположили, что важным этапом этого процесса может быть увеличение расщепления фосфатидилинозита [65, 66]. По этому поводу можно заметить, что хотя опосредованные  $\alpha$ -рецепторами эффекты иногда являются медленными, например в сердце млекопитающих [85], в несколько меньшей степени в сердце лягушки [69], но все же, как правило, они протекают быстро. Так, гиперполяризация, вызванная ионофоретическим нанесением  $\alpha$ -агонистов на изолированные клетки печени морских свинок, развивается в течение нескольких секунд. Реакция на выделяемый первами норэпинефрин обычно развивается еще быстрее. Например, возбуждающий потенциал концевой пластинки в мышце апососсугеус крыс достигает своего максимального значения менее чем за 1 с [20]; тот же эффект в подслизистых артериолах развивается за 100 мс с латентным периодом менее 10—15 мс [43]. Возбуждающий потенциал концевой пластинки в *vas deferens* достигает максимума еще быстрее, хотя роль норэпинефрина

как «быстрого» трансмиттера в этой ткани окончательно не доказана [2, 41]. Может ли расщепление фосфатидилинозита возрасти до необходимого значения за такое непродолжительное время, пока остается неясным, и ответ на этот вопрос может оказаться решающим для судьбы высказанной гипотезы. И действительно, Oron, Löwe и Schinger [71], выполняя кинетические исследования на околушной железе крысы, пришли к выводу, что в этой ткани быстрота физиологического ответа не согласуется с возможной ролью фосфатидилинозита.

Наконец, следует упомянуть предположение, что в опосредованном  $\alpha$ -рецепторами ответе участвует цГМФ. Большинство подтверждений этого предположения получено в экспериментах на гладкой мышце, в частности на *vas deferens* крысы, где активация  $\alpha$ -рецепторов приводит к заметному повышению уровня цГМФ [83]. Однако факт, что эта взаимосвязь имеет прямой характер, не является очевидным. И действительно, возрастанию уровня цГМФ может предшествовать сократительный эффект, и тогда оно может скорее рассматриваться как следствие, а не как причина увеличения содержания внутриклеточного кальция, вызывающего сокращение; подтверждение этого и обсуждение проблемы изложено в [34]. Общность упомянутой гипотезы ставится под сомнение и обнаруженным фактом, что содержание цГМФ не возрастает в процессе вызванных норэпинефрином сокращений полосок аорты крысы [97], но увеличивается при действии некоторых агентов, вызывающих расслабление гладкой мышцы [54, 82]. Таким образом, роль цГМФ также пока не выяснена.

### ВЛИЯНИЕ ДОПАМИНА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

О влиянии рецепторов допамина на мембраны клеток млекопитающих известно пока очень мало, несмотря на большой интерес, проявляемый к допамину как к нейротрансмиттеру. Пока большая часть исследований на intactной центральной нервной системе была направлена на выяснение изменений возбудимости нейронов; существует лишь несколько сообщений о мембранных феноменах, лежащих в основе этих изменений [58]. Обнаруженный Greengard, Iversen и соавт. [36, 55, 67] факт активации допаминном аденилатциклазы в препаратах мембран из участков мозга, в которых допамин является трансмиттером, позволяет предположить, что в постсинаптическом действии допамина участвует и повышение уровня цАМФ, хотя детальный механизм этого явления остается неясным.

Два важных исследования были выполнены на тканях беспозвоночных. В экспериментах на нейронах *Aplysia* обнаружено [4], что допамин обладает как возбуждающим, так и тормозным свойством, причем оба этих действия опосредуются различными рецепторами. Торможение может быть объяснено увеличением проницаемости для калия определенных участков мембраны нейрона.

В слюнной железе таракана допамин, являющийся предположительно нейросекреторным трансмиттером, вызывает, по данным Ginsborg, House и Silinsky [31], гиперполяризацию, также связанную с повышением проводимости калия. Этот эффект опосредован рецептором допамина, аналогичным обнаруженному в центральной нервной системе млекопитающих [32]. Специфический рецептор допамина участвует также в повышении проводимости (в этом случае вызывающем падение мембранного потенциала и, следовательно, возможно связанном с повышением натриевой проницаемости), которое допамин вызывает в клетках ТСХ11, представляющих собой гибрид соматических нейронов позвоночных [68].

Жировые клетки в бурой жировой ткани также деполяризуются под действием допамина [25]. В этом случае указанная реакция может быть устранена под действием низких концентраций фентоламина, но не под влиянием селективного антагониста допамина — пимозида, что позволяет предположить участие в процессе скорее  $\alpha$ -рецепторов, чем специфических рецепторов допамина. Тот факт, что допамин способен активировать как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -рецепторы [33], только усложняет задачу установления механизма его действия на ткани, одновременно содержащие различные рецепторы.

#### ВЛИЯНИЕ $\beta$ -АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

Как уже упоминалось, первые же эксперименты по изучению влияния катехоламинов на проницаемость мембраны в состоянии покоя показали, что этот эффект опосредован скорее  $\alpha$ -, чем  $\beta$ -рецепторами. Дальнейшие работы позволили предположить, что в этом отношении между тканями могут быть достаточно большие различия. Так, показано, что  $\beta$ -рецепторы способны увеличивать калиевую проницаемость в гладкой мускулатуре матки крыс [59], а также повышать интенсивность потоков натрия и калия в эритроцитах индейки, инкубируемых в растворах, не содержащих кальция [28]. Кроме того,  $\beta$ -рецепторы повышают проницаемость для хлорида в эпителии роговицы кролика [56].

Имеется также ряд сообщений об опосредованных  $\beta$ -рецепторами эффектах, связанных с изменением мембранного потенциала, которые, хотя это прямо и не показано, могут быть следствием увеличения проницаемости мембран. Изменения потенциала могут быть разнонаправленными: бурые жировые [25] и зернистые клетки слюнной железы [75, 76] деполяризуются, тогда как в гладких мышцах сосудов [93], шишковидной железе [80] и печени собак [60] наблюдается гиперполяризация. В этом отношении особый интерес представляют паренхимальные клетки печени морских свинок и кроликов, поскольку в них активация  $\beta$ -рецепторов до уровней, вызывающих максимальное высвобождение глюкозы, обычно обуславливает весьма незначительные изменения

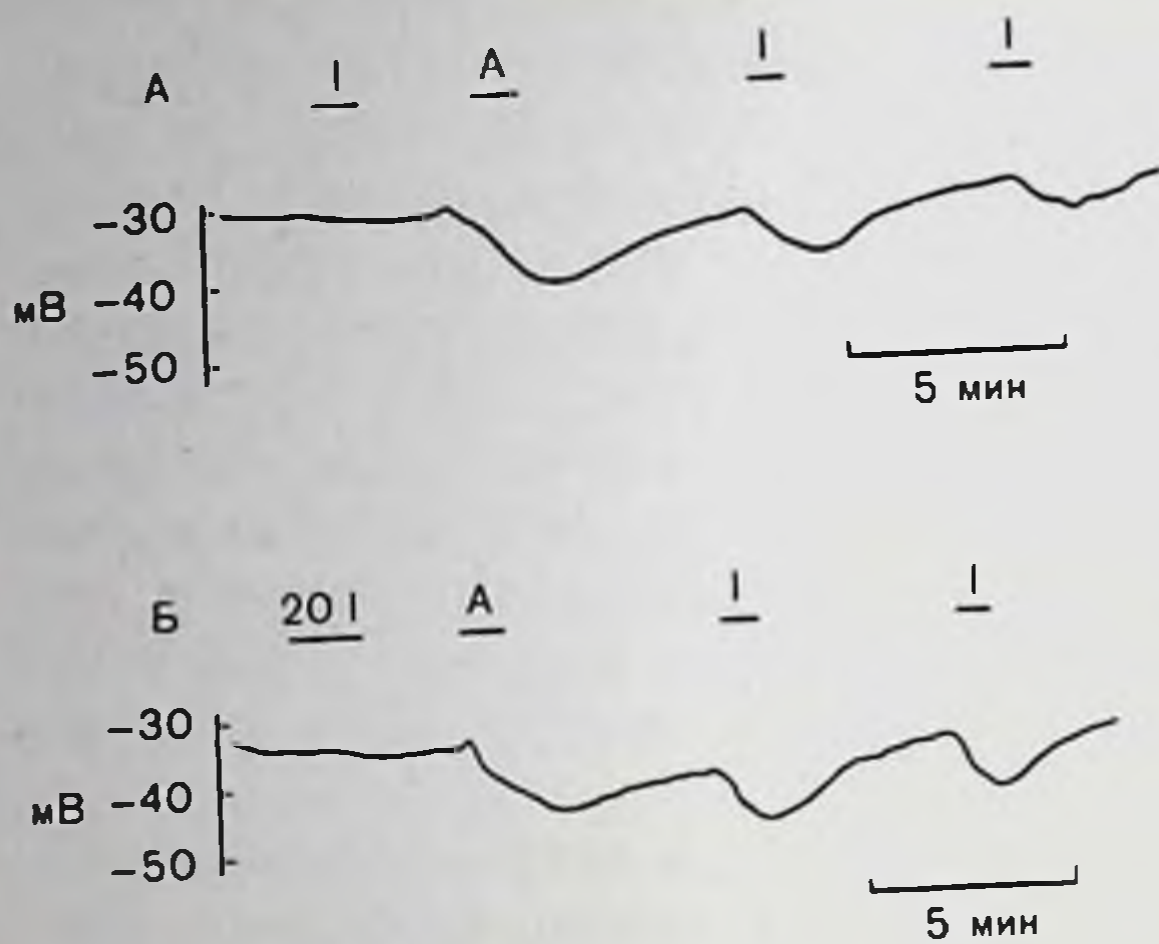


Рис. 24. А — потенцирование  $\alpha$ -агонистов (—)-амидэфрином (10  $\mu\text{M}$ , наносится в момент А) эффекта  $\beta$ -агониста (—)-изопреналина (50 нМ, действует в момент 1) на мембранный потенциал клетки среза печени морской свинки; Б — аналогично А, за исключением того, что первый раз изопреналин действует в концентрации, в 20 раз большей (1  $\mu\text{M}$ , интервал 20 1) [49].

и в мембранном потенциале и в выходе ионов калия и кальция (см. рис. 23). [37, 39, 40]. Однако значительное увеличение выхода ионов и изменение потенциала наблюдаются, если  $\beta$ -рецепторы активируют в процессе или после действия  $\alpha$ -агонистов [40, 49]. Эта роль  $\beta$ -рецепторов в изменении мембранного потенциала показана на рис. 24. При изучении фармакологии этого явления мы обнаружили, что мембранные эффекты  $\beta$ -активации могут также усиливаться и при действии некоторых других агентов, отличающихся от  $\alpha$ -агонистов [49]. Примерами таких агентов могут служить АДФ и АТФ, которые сами по себе вызывают гиперполяризацию клеток печени. Хотя механизм этого усиления еще не установлен, оно, по-видимому, проходит ряд стадий, следующих за активацией  $\beta$ -рецепторов. Одной из ранних стадий является повышение активности аденилатциклазы, поэтому особенно интересно было обнаружить, что реакция клеток на действующий извне цАМФ также усиливается при предварительном действии  $\alpha$ -агонистов (рис. 25). По-видимому, усиление  $\beta$ -реакций может отражать изменение пути, по которому мембраны клеток печени реагируют на повышение уровня цитоплазматического цАМФ. Как указано Helmreich в процессе обсуждения данной работы, этот аргумент является решающим в поддержке предположения, что действие наружного цАМФ вызывает возрастание его концентрации на внутренней стороне мембраны. Хотя доказательства этого не так исчерпывающи, как хотелось бы, существуют все основания думать, что цАМФ способен и входить [98] и выходить [24] из клеток печени, вероятно, посредством особого транспортного механизма. Дополнительное обсуждение см. [49].

На основе всех этих наблюдений можно поставить основной вопрос о влиянии цАМФ на ионную проницаемость клеточных мембран. Следует напомнить, что, как было показано, некоторые нейротрансмиттеры (включая допамин) способны активировать аденилатциклазу; важно также знать, действительно ли мембранное действие цАМФ является важным этапом передачи на соответствующие синапсы. Хотя и существует немало доказательств



этого, стоит вспомнить, что в некоторых тканях (например, в скелетной мышце млекопитающих, *taenia coli*, *vas deferens* и печени морских свинок) повышение уровня внутриклеточного цАМФ, несомненно вызываемое  $\beta$ -рецепторами, оказывает очень небольшое влияние на проницаемость мембран. Возможное объяснение, заключающееся в «компартиментализации» цАМФ, в результате чего он просто не может достичь мембраны, является не очень убедительным.

Для тканей, отвечающих на рассматриваемые влияния изменением проницаемости, выдвинута гипотеза, что цАМФ (как это происходит при многих, если не при всех его действиях) активирует протеникиназу, которая в свою очередь катализирует фосфорилирование мембранного белка, регулирующего прохождение ионов через мембрану [36, 105]. Другая возможность состоит в том, что влияние на проницаемость может быть вторичным по отношению к индуцированному цАМФ изменению концентрации кальция около внутренней поверхности клеточной мембраны [7]. В действительности эти гипотезы могут и не быть взаимоисключающими, поскольку фосфорилирование (хотя и не необходимое на поверхностной мембране) может представлять важную стадию в высвобождении кальция. Так, выявление того факта, что изопреналин повышает выход  $^{45}\text{Ca}$  из клеток печени, особенно после действия  $\alpha$ -агониста (рис. 26), немаловажно для подтверждения соображения о способности цАМФ некоторым образом «мобилизовать» кальций [26]. Однако возможно также, что увеличение выхода кальция отражает изменение в проницаемости для него мембраны, следующее за фосфорилированием мембранного компонента.

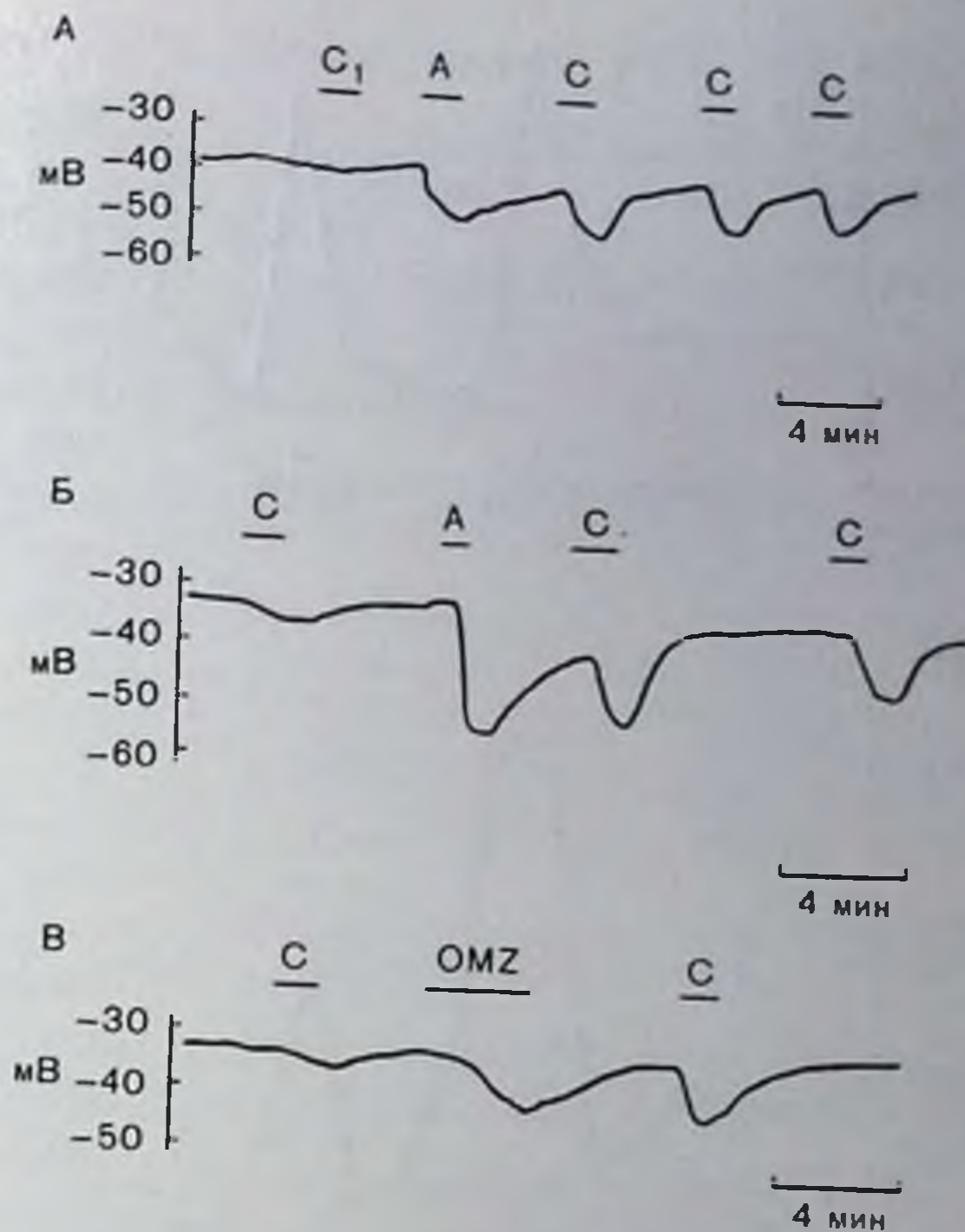


Рис. 25. А — потенцирование (—)-амидэфрином (10 мкМ, момент А) действия циклического АМФ (2 мМ в момент С<sub>1</sub>, 0,5 мМ в момент С) на мембранный потенциал клетки среза печени морской свинки; Б — то же самое для другого препарата, инкубируемого в растворе, не содержащем хлорида; В — то же, что и на рис. 25, Б, но действие циклического АМФ потенцируется другим  $\alpha$ -агонистом оксиметазолином (2 мкМ, действует в интервале времени, обозначенном ОМЗ [49]).

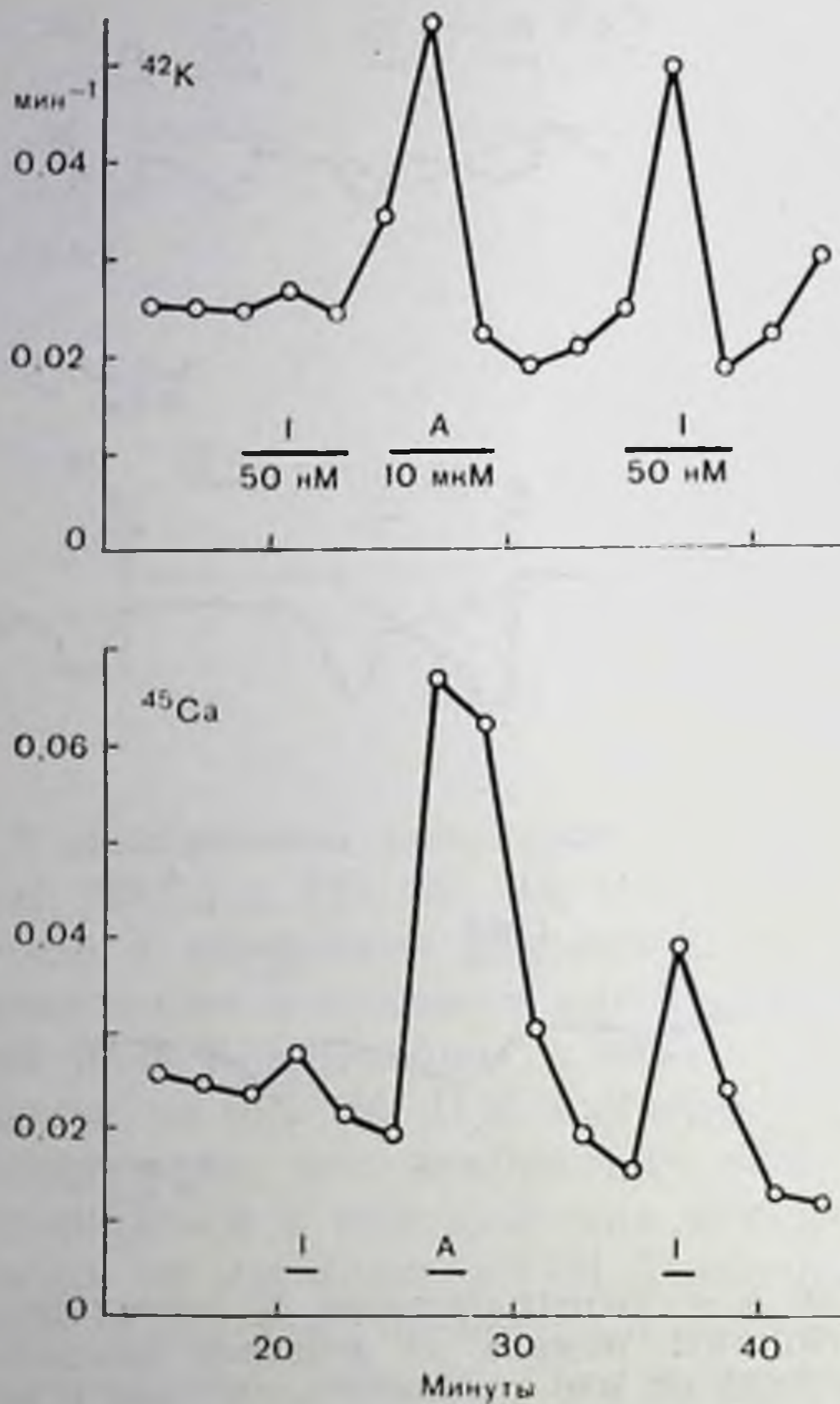


Рис. 26. Потенцирование (—)-амидэфрином (10 мкМ, наносится в момент А) незначительного влияния (—)-изопреналина (50 нМ, наносится в момент I) на выход меченых кальция и калия из срезов печени морской свинок.

По оси ординат — коэффициент скорости выхода  $^{42}\text{K}$  (верхняя кривая) и  $^{45}\text{Ca}$  (нижняя кривая); по оси абсцисс — время после удаления образцов из раствора.

мембраны нечувствительны к активации  $\beta$ -рецепторов, тогда как в других тканях (например, паренхимальных клетках печени кролика или морской свинок) влияние  $\beta$ -рецепторов становится заметным только при активации других рецепторов. Молекулярный механизм влияния  $\alpha$ -,  $\beta$ - и допаминовых рецепторов на мембранную проницаемость остается неясным: не исключено, что на него воздействуют изменения уровня внутриклеточного кальция и фосфорилирование мембранных белков.

Следует также иметь в виду, что существуют и другие механизмы, по которым цАМФ может влиять на мембранный потенциал. Так, например, опосредованная  $\beta$ -рецепторами гиперполяризация в различных тканях по крайней мере частично может быть приписана активации электрогенного насоса вследствие активного транспорта ионов или натрия, как в матке крыс [24], симпатических ганглиях лягушки-быка [57], гладких мышцах сосудов [92, 93] и скелетных мышцах млекопитающих [49] или кальция, как в матке крыс [63], *Caenia coli* морских свинок [13].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время известно, что как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -адренергические рецепторы могут влиять на ионную проницаемость клеточных мембран. Результатом этого может быть подъем или падение мембранного потенциала в зависимости от природы участвующих в процессе ионов.  $\beta$ -Реакции особенно заметно варьируют от клетки к клетке: некоторые клеточные

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahlquist R. P. A study of the adrenotropic receptors. — *Am. J. Physiol.*, 1948, 153, 586—600.
2. Ambache N., Zar M. A. Evidence against adrenergic motor transmission in

- the guinea-pig vas deferens. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1971, 216, 359—389.
3. *Andersson R., Nilsson K., Wikberg J., Johansson S., Mohme-Lundholm E., Lundholm L.* Cyclic nucleotides and the contraction of smooth muscle. — *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1975, 5, 491—518.
  4. *Ascher P.* Inhibitory and excitatory effects of dopamine on *Aplysia* neurones. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1972, 225, 173—209.
  5. *Assimacopoulos-Jeannet F. D., Blackmore P. F., Exton J. H.* Studies on  $\alpha$ -adrenergic activation of hepatic glucose output. — *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 2662—2669.
  6. *Batzri S., Selinger Z., Schramm M., Robinovitch M. R.* Potassium release mediated by the epinephrine  $\alpha$ -receptor in rat parotid slices. — *J. Biol. Chem.*, 248, 361—368, 1973.
  7. *Berridge M. J.* The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. — *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1975, 6, 1—98.
  8. *Bogach P. G., Klevets M. Y.* Effect of noradrenaline and adrenaline on the membrane potential and membrane resistance of the cells of smooth muscles to direct electric current in solutions devoid of sodium and chloride ions. *Biofizika*, 1967, 12, 997—1001 (Engl. translation, *Biophysics*, 12, 1140—1146, 1967).
  9. *Born G. V. R., Bülbring E.* The movement of potassium between smooth muscle and the surrounding fluid. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1956, 131, 690—703.
  10. *Brown H. F., McNaughton P. A., Noble D., Noble S. J.* Adrenergic control of pacemaker currents. — *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1975, 270, 527—537.
  11. *Bülbring E.* Membrane potentials of smooth muscle fibres of the taenia coli of the guinea-pig. — *J. Physiol. (Lond.)*, 125, 1954, 302—315.
  12. *Bülbring E.* Action of catecholamines on the smooth muscle cell membrane. — In: *Drug Receptors*, edited by H. P. Rang, pp. 1—13. 1973, Macmillan, London.
  13. *Bülbring E., den Hertog A.* The  $\beta$ -action of catecholamines on the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 268, 29—30P.
  14. *Bülbring E., Szurszewski J. H.* The stimulant action of noradrenaline ( $\alpha$ -action) on guinea-pig myometrium compared with that of acetylcholine. — *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1974, 185, 225—262.
  15. *Bülbring E., Tomita T.* Increase of membrane conductance by adrenaline in the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. — *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1969, 172, 89—102.
  16. *Bülbring E., Tomita T.* The  $\alpha$ -action of catecholamines on the guinea-pig taenia coli in K-free and Na-free solution and in the presence of ouabain. — *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1977, 197, 255—269.
  17. *Bülbring E., Tomita T.* Calcium requirement for the  $\alpha$ -action of catecholamines on guinea-pig taenia coli. — *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1977, 197, 271—284.
  18. *Cherrington A. D., Assimacopoulos F. D., Harper S. C., Corbin J. D., Park C. R., Exton H. J.* Studies on the  $\alpha$ -adrenergic activation of hepatic glucose output. II. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 5209—5218.
  19. *Clausen T., Flatman J. A.* The effect of catecholamines on Na-K transport and membrane potential in rat soleus muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 270, 383—414.
  20. *Creed K. E.* Membrane properties of the smooth muscle cells of the rat anococcygeus muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 245, 49—62.
  21. *Creed K. E., Gillespie J. S., Muir T. C.* The electrical basis of excitation and inhibition in the rat anococcygeus muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 245, 33—47.
  22. *Daniel E. E., Paton D. M., Taylor G. S., Hodgson B. J.* Adrenergic receptors for catecholamine effects on tissue electrolytes. — *Fed. Proc.*, 1970, 29, 1410—1425.
  23. *Deth R., van Breemen C.* Relative contributions of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and cellular  $\text{Ca}^{2+}$  release during drug induced activation of the rabbit aorta. — *Pflügers Arch.*, 1974, 348, 13—22.

24. *Deth R., van Breemen C.* Agonist induced release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the rabbit aorta. — *J. Membr. Biol.*, 1977, 30, 363—380.
25. *Exton J. H., Lewis S. B., Ho R. J., Park C. R.* The role of cyclic AMP in the control of hepatic glucose production by glucagon and insulin. — *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1972, 1, 91—101.
26. *Fink S. A., Williams J. A.* Adrenergic receptors mediating depolarization in brown adipose tissue. — *Am. J. Physiol.*, 1976, 231, 700—706.
27. *Friedmann N., Park C. R.* Early effects of 3',5'-adenosine monophosphate on the fluxes of calcium and potassium in the perfused liver of normal and adrenalectomized rats. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, 61, 504—508.
28. *Furchgott R. F.* The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. — *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, 1972, 33, 283—335.
29. *Gardner J. D., Mensh R. S., Kiino D. R., Aurbach G. D.* Effects of  $\beta$ -adrenergic catecholamines on potassium transport in turkey erythrocytes. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 1155—1163.
30. *Ginsborg B. L.* Ion movements in junctional transmission. — *Pharmacol. Rev.*, 1967, 19, 289—316.
31. *Ginsborg B. L.* Electrical changes in the membrane in junctional transmission. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 300, 289—317.
32. *Ginsborg B. L., House C. R., Silinsky E. M.* Conductance changes associated with the secretory potential in the cockroach salivary gland. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1974, 236, 723—731.
33. *Ginsborg B. L., House C. R., Silinsky E. M.* On the receptors which mediate the hyperpolarization of salivary gland of *Nauphoeta cinerea* Oliver. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1976, 262, 489—500.
34. *Goldberg L. I.* Cardiovascular and renal actions of dopamine: Potential clinical applications. — *Pharmacol. Rev.*, 1972, 24, 1—29.
35. *Goldberg N. D., Haddox M. K., Nicol S. E., Glass D. B., Sanford C. H., Kuehl F. A., Estensen R.* Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: The Yin Yang hypothesis. — *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1975, 5, 307—330.
36. *Green R. D., Dale M. M., Haylett D. G.* Effect of adrenergic amines on the membrane potential of guinea-pig liver parenchymal cells in short term tissue culture. — *Experientia*, 1972, 28, 1073—1074.
37. *Greengard P.* Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. — *Nature*, 1976, 260, 101—108.
38. *Haylett D. G.* Effects of sympathomimetic amines on  $^{45}\text{Ca}$  efflux from liver slices. — *Br. J. Pharmacol.*, 1976, 57, 158—160.
39. *Haylett D. G., Jenkinson D. H.* Effects of noradrenaline on potassium efflux, membrane potential and electrolyte levels in tissues slices prepared from guinea-pig liver. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1972, 225, 721—750.
40. *Haylett D. G., Jenkinson D. H.* The receptors concerned in the actions of catecholamines on glucose release, membrane potential and ion movements in guinea-pig liver. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1972, 225, 751—772.
41. *Haylett D. G., Jenkinson D. H.* Actions of catecholamines on the membrane properties of liver cells. — In: *Drug Receptors*, edited by H. P. Rang, 1973, pp. 15—25. Macmillan, London.
42. *Hedqvist P., Von Euler U. S.* Inhibition by  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoreceptors of the twith response to transmural stimulation in the guinea-pig vas deferens. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1976, 40, 153—162.
43. *Heyer C. B., Lux H. D.* Control of the delayed outward potassium currents in bursting pace-maker neurones of the snail, *Helix pomatia*. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1976, 262, 349—382.
44. *Hirst G. D. S.* Neuromuscular transmission in arterioles of guineapig submucosa. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 273, 263—275.
45. *Hittelman K. J., Wu C. F., Butcher R. W.* Control of cyclic AMP levels in isolated fat cells from hamsters. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 304, 188—196.
46. *Horowitz J. M., Horwitz B. A., Smith R. E.* Effect in vivo of norepinephrine

- on the membrane resistance of brown fat cells. — *Experientia*, 1971, 27, 1419—1421.
47. *Hutson N. J., Brumley F. T., Assimacopoulos F. D., Harper S. C., Exton J. H.* Studies on the  $\alpha$ -adrenergic activation of hepatic glucose release. I. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 5200—5208.
  48. *Inomata H., Kao C. Y.* A voltage-clamp study of the adrenaline hyperpolarization in the guinea-pig taenia coli. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1972, 226, 53—54P.
  49. *Jenkinson D. H.* Classification and properties of peripheral adrenergic receptors. — *Br. Med. Bull.*, 1973, 29, 142—147.
  50. *Jenkinson D. H., Koller K.* Interactions between the effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor agonists and adenine nucleotides on the membrane potential of cells in guinea-pig liver slices. — *Br. J. Pharmacol.*, 1977, 59, 163—175.
  51. *Jenkinson D. H., Morton I. K. M.* The effect of noradrenaline on the permeability of depolarized intestinal smooth muscle to inorganic ions. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1967, 188, 373—386.
  52. *Jenkinson D. H., Morton I. K. M.* The role of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in some actions of catecholamines on intestinal smooth muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1967, 188, 387—402.
  53. *Jenkinson D. H., Morton I. K. M.* Adrenergic blocking drugs as tools in the study of the action of catecholamines on the smooth muscle membrane. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1967, 139, 762—771.
  54. *Kao C. Y., Inomata H., McCullough J. R., Yuan J. C.* Voltage clamp studies on the actions of catecholamines and adrenergic blocking agents on mammalian smooth muscles. — In: *Smooth Muscle Pharmacology and Physiology*, edited by Worcel M., Vassort G., 1976, pp. 165—176. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.
  55. *Katsuki S., Murad F.* Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. — *Mol. Pharmacol.*, 1977, 13, 330—341.
  56. *Kebabian J. W., Petzold G. L., Greengard P.* Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 2145—2149.
  57. *Klyce S. D., Wong R. K. S.* Site and mode of adrenaline action on chloride transport across the rabbit corneal epithelium. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 266, 777—799.
  58. *Koketsu K., Nakamura M.* The electrogenesis of adrenaline hyperpolarization of sympathetic ganglion cells in bullfrogs. — *Jpn. J. Physiol.*, 1976, 26, 63—77.
  59. *Krnjević K.* Electrophysiology of dopamine receptors. — In: *Advances in Neurology*, v. 9, edited by D. B. Calne, T. N. Chase, A. Barbeau, 1975, pp. 13—24, Raven Press, New York.
  60. *Kroeger E. A., Marshall J. M.* Beta-adrenergic effects on rat myometrium: Mechanisms of membrane hyperpolarization. — *Am. J. Physiol.*, 1973, 225, 1339—1345.
  61. *Lambotte L.* Effect of activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors on the hepatic cell membrane potential in the perfused dog liver. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 232, 181—192.
  62. *Langer S. Z.* Presynaptic regulation of catecholamine release. — *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1793—1800.
  63. *Magaribuchi T., Ito Y., Kuriyama H.* Effects of catecholamines on the guinea-pig vas deferens in various ionic environments. — *Jpn. J. Physiol.*, 1971, 21, 691—708.
  64. *Marshall J. M., Kroeger E. A.* Adrenergic influences on uterine smooth muscle. *Philos. — Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1973, 265, 135—148.
  65. *Mekata F., Niu H.* Biophysical effects of adrenaline on the smooth muscle of the rabbit common carotid artery. — *J. Gen. Physiol.*, 1972, 59, 92—102.
  66. *Michell R. H.* Inositol phospholipids and cell surface receptor function. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 415, 81—147.

67. Jones L. M., Michell R. H. Stimulus-response coupling at  $\alpha$ -adrenergic receptors. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1978 (in press).
68. Miller R., Horn A., Iversen L., Pinder R. Effects of dopaminelike drugs on rat striatal adenylyl cyclase have implications for CNS dopamine receptor topography. — *Nature*, 1974, 250, 238—241.
69. Myers P. R., Livengood D. R., Shain W. Characterization of a depolarizing dopamine response in a veritable neuronal somatic cell hybrid. — *J. Cell. Physiol.*, 1977, 91, 103—118.
70. Niedergerke R., Page S. Analysis of catecholamine effects in single atrial trabeculae of the frog heart. — *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 1977, 197, 333—362.
71. Ohashi H. The relative contribution of K and Cl to the total increase of membrane conductance produced by adrenaline on the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1971, 212, 561—575.
72. Oron Y., Löwe M., Selinger Z. Incorporation of inorganic [ $^{32}$ P] phosphate into rat parotid phosphatidyl inositol. — *Mol. Pharmacol.*, 1975, 11, 79—86.
73. Osborn D. Comparison of the effects of selective  $\alpha$ - and  $\beta$ -receptor agonists on intracellular cyclic AMP levels and glycogen phosphorylase activity in guinea-pig liver. — *Br. J. Pharmacol.*, 1975, 55, 286—287P.
74. Perkins J. P., Moore M. M. Characterisation of the adrenergic receptors mediating a rise in cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in rat cerebral cortex. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1973, 185, 371—378.
75. Perry M. C., Hales C. N. Factors affecting the permeability of isolated fat-cells from the rat to  $^{42}$ K potassium and  $^{36}$ Cl chloride ions. — *Biochem. J.*, 1970, 117, 615—621.
76. Petersen O. H. Increase in membrane conductance by adrenaline parotid acinar cells. — *Experientia*, 1976, 32, 471—472.
77. Petersen O. H., Petersen G. L. Membrane effects mediated by alpha- and beta-adrenoceptors in mouse parotid acinar cells. — *J. Membr. Biol.*, 1974, 16, 353—362.
78. Putney J. W. Biphasic modulation of potassium release in rat parotid gland by carbachol and phenylephrine. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, 198, 375—384.
79. Putney J. W. Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 268, 139—149.
80. Reuter H., Scholz H. The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 264, 49—62.
81. Sakai K., Marks B. H. Adrenergic effects on pineal cell membrane potential. — *Life Sci.*, 1972, 11, 285—291.
82. Schild H. O. Receptor classification with special reference to  $\beta$ -adrenergic receptors. — In: *Drug Receptors*, edited by H. P. Rang, 1973, pp. 29—36. Macmillan, London.
83. Schultz G. Smooth muscle-relaxing agents increase the cyclic GMP level rat ductus deferens. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1977, 297 R11.
84. Schultz G., Hardman J. G., Schultz K., Davis J. W., Sutherland E. W. A new enzymatic assay for guanosine 3',5'-cyclic monophosphate and its application to the ductus deferens of the rat. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 1721—1725.
85. Schultz J., Daly J. W. Accumulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in cerebral cortical slices from rat and mouse: Stimulatory effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agents and adenosine. — *J. Neurochem.*, 1973, 21, 1319—1326.
86. Schülmann H. J., Endoh M., Brodde O. E. The time course of the effects of  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation by isoprenaline and methoxamine on the contractile force and cAMP level of the isolated rabbit papillary muscle. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1975, 289, 291—302.
87. Selinger Z., Batzri S., Eimerl S., Schramm M. Calcium and energy requirements for K<sup>+</sup> release mediated by the epinephrine  $\alpha$ -receptor in rat parotid slices. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 369—372.

88. *Selinger Z., Eimerl S., Schramm M.* A calcium ionophore simulating the action of epinephrine on the  $\alpha$ -adrenergic receptor. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 128—131.
89. *Sherline P., Lynch A., Glinsmann W. H.* Cyclic AMP and adrenergic receptor control of rat liver glycogen metabolism. — *Endocrinology*, 1972, 91, 680—690.
90. *Shuba M. F.* The mechanism of the excitatory action of catecholamines and histamine on the smooth muscle of guinea-pig ureter. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 264, 853—864.
91. *Shuba M. F., Gurkovskaya A. V., Klevetz M. J., Kochemasova N. G., Taranenko V. M.* Mechanism of the excitatory and inhibitory actions of catecholamines on the membrane of smooth muscle cells. — In: *Physiology of Smooth Muscle*, edited by E. Bülbbring, M. F. Shuba, 1976, pp. 347—355. Raven Press, New York.
92. *Skolnick P., Daly J. W.* Strain differences in responsiveness of norepinephrine-sensitive adenosine 3',5'-monophosphate-generating systems in rat brain slices after intraventricular administration of 6-hydroxydopamine. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1977, 41, 145—192.
93. *Somlyo A. P., Somlyo A. V.* Vascular smooth muscle: II. Pharmacology of normal and hypertensive vessels. — *Pharmacol. Rev.*, 1970, 22, 249—353.
94. *Somlyo A. P., Somlyo A. V., Smieško V.* Cyclic AMP and vascular smooth muscle. — *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1972, 1, 175—194.
95. *Stafford A.* Adrenaline, anti-adrenaline drugs and potassium movements in rabbit auricles. — *Br. J. Pharmacol.*, 1962, 19, 274—285.
96. *Starke K., Taube H. D., Borowski E.* Presynaptic receptor systems in catecholaminergic transmission. — *Biochem. Pharmacol.*, 1977, 26, 259—268.
97. *Stjärne L.* Basic mechanisms and local feedback control of secretion of adrenergic and cholinergic neurotransmitters. — In: *Handbook of Psychopharmacology*, v. 6, ed. by L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. H. Snyder, 1975, pp. 179—233. Plenum Press, New York — London.
98. *Stoclet J.-C., Michon T., Scheffel J.-M., Demesy-Waeldele F.* Calcium and regulation of cyclic nucleotide in rat aorta. — In: *Ionic Actions on Vascular Smooth Muscle*, ed. by E. Betz, 1976, pp. 34—38. Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.
99. *Strange R. C., Percy-Robb I. W.* Hepatic clearance of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate from plasma in the rat. — *Biochem.*, 1975, 146, 509—512.
100. *Tomita T., Sakamoto Y., Ohba M.* Conductance increase by adrenaline in guinea-pig taenia coli studied with voltage clamp method. — *Nature*, 1974, 250, 432—433.
101. *Tsien R. W.* Cyclic AMP and contractile activity in heart. — *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1977, 8, 363—420.
102. *Turtle J. R., Kipnis D. M.* An adrenergic mechanism for the control of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate synthesis in tissues. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 28, 797—802.
103. *Vassort G.* Voltage-clamp analysis of transmembrane ionic currents in guinea-pig myometrium: Evidence for an initial potassium activation triggered by calcium influx. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 252, 713—734.
104. *Wahlström B. A.* A study of the action of noradrenaline on ionic content and sodium, potassium and chloride effluxes in the rat portal vein. — *Acta Physiol. Scand.*, 1973, 89, 522—530.
105. *Wahlström B. A., Svennerholm B.* Potentiation and inhibition of noradrenaline induced contractions of the rat portal vein in anion substituted solutions. — *Acta Physiol. Scand.*, 1974, 92, 404—411.
106. *Williams M., Rodnight R.* Protein phosphorylation in nervous tissue: Possible involvement in nervous tissue function and relationship to cyclic nucleotide metabolism. — *Prog. Neurobiol.*, 1977, 8, 183—250.

# ОСНОВАНИЯ ДЛЯ РАЗГРАНИЧЕНИЯ ДВУХ ТИПОВ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

ЖОФФРЕЙ БЕРНСТОК  
(GEOFFREY BURNSTOCK)

*Отдел анатомии и эмбриологии, Университетский колледж Лондона,  
Лондон WC1E6BT, Англия*

## ВВЕДЕНИЕ

В течение многих лет АТФ рассматривается в основном как источник внутриклеточной энергии, однако признается, что пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды оказывают сильное внеклеточное действие на возбуждаемые мембраны и могут участвовать в физиологических регуляторных процессах [9, 18, 19, 37, 66].

В статье, посвященной пуринергическим рецепторам, Burnstock [20] обсудил различные аспекты действия пуриновых нуклеотидов и нуклеозидов, включая их относительную активность при влиянии на различные ткани, их ингибиторное и возбуждающее действие и связанное с ним изменение мембранного потенциала и проводимости, взаимосвязь между их структурой и активностью, а также лекарственные соединения, о которых известно, что они являются антагонистами или медиаторами перечисленных эффектов.

В настоящем разделе приведены данные, свидетельствующие о том, что пуринергические рецепторы могут быть разделены на два типа подобно тому, как разработана классификация адренергических рецепторов на  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы [2], холинергических — на мускариновые и никотиновые [32], гистаминовых — на H1- и H2-рецепторы [15]. Основанием для разграничения этих рецепторов было изучение селективного действия агонистов и антагонистов [104]. Изучение различных эффектов, вызываемых адениннуклеотидами и нуклеозидами, а также агентами, блокирующими их действие [18—20, 48, 49], позволило разделить пуринергические рецепторы на два типа: P1- и P2-пуринорецепторы (табл. 7).

Т а б л и ц а 7

Антагонисты	Относительная эффективность агонистов	Изменения цАМФ
P1 Метилксантины	Аденозин $\geq$ АМФ $>$ АДФ $\geq$ $\geq$ АТФ	Есть
P2 Хинидин Двузамещенные имидазолы 2'2-Пиридилиза- тоген	АТФ $\geq$ АДФ $>$ АМФ $\geq$ Адено- зин	Нет



## АНТАГОНИСТЫ

### P1-пуринорецепторы

Метилксантины, в частности теофиллин, кофеин и аминофиллин, являются сильными ингибиторами действия аденозина на различные ткани, хотя они могут и не оказывать влияния на действие АТФ на другие ткани. Так, например, метилксантины блокируют вызываемые аденозином расширение сосудов в сердце [1, 31, 88, 102], мозге [10, 40, 75] и легких [71], сжатие сосудов в системе почечной циркуляции [77], расслабление трахеи [30], кишечника [3, 76] и предсердий [35, 94], пресинаптическое ингибирование высвобождения ацетилхолина и норэпинефрина соответственно из холинергических и адренергических нервных окончаний [38, 45, 51, 93, 105], ингибирование активности мозговых и мозжечковых нейронов [67, 69, 83, 84, 92, 96], повышение уровня цАМФ в клетках мышечной нейробластомы [16] и в костных клетках [79]. С другой стороны, метилксантины практически не оказывают влияния на вызываемое АТФ расширение сосудов в почках и сердце [49], сокращение трахеи [30], мочевого пузыря (Cocks, Brown и Burnstock, неопубликованные наблюдения) и терминального отдела кишечника морских свинок [59], а также расслабление желудка и кишечника [22, Cocks, Wong и Burnstock, неопубликованные наблюдения].

Было высказано предположение, что действие теофиллина как антагониста аденозина носит конкурентный характер в коре головного мозга морских свинок [92], предсердиях человека и морской свинки [35], кишечнике кроликов и морских свинок [3, 76], холинергических окончаниях в кишечнике морских свинок [73, 93], трахее морских свинок [29], сосудах почек [77] и клетках астроцитомы человека [27]. Для такого предположения имеются следующие основания:

1. Антагонизм легкообратим при любых концентрациях веществ.

2. Увеличение концентрации аденозина позволяет устранить антагонистическое действие теофиллина.

3. Наклоны кривых зависимостей величины ответа от концентрации аденозина в присутствии теофиллина не слишком отличались от наклонов соответствующих контрольных кривых, точнее первые кривые несколько сдвигались вправо, оставаясь параллельными контрольным. Значения  $pA_2$  для теофиллина, рассчитанные по методу Arunlakshana и Schild [7], составляли 5,6 для сосудов почек собак [77] и 4,7 для трахеи морских свинок [30]. Эти значения заметно ниже, чем установленные для конкурентных антагонистов ацетилхолиновых (мускариновых), катехоламиновых и гистаминовых рецепторов, которые обычно имеют значение  $pA_2$  выше 8,0. Однако наклон кривых близок к единице, что соответствует теоретическому значению, которое должно свидетельствовать о наличии конкурентного антагонизма.

Относительно невысокие значения  $pA_2$  для теофиллина могут быть интерпретированы в терминах других известных эффектов, вызываемых этим лекарством. Так, например, было показано, что низкая концентрация метилксантинов вызывает мобилизацию внутриклеточных пулов кальция [13, 58, 62, 73]. Известно также, что теофиллин ингибирует действие фосфодиэстеразы [4, 12, 26, 86], правда в концентрациях больших, чем концентрации, необходимые для блокирования аденозина [76, 93]. Кроме того, некоторые другие ингибиторы фосфодиэстеразы, например панаверин, теобромин и 3-изобутил-1-метилксантин, усиливают действие аденозина, тогда как теофиллин является в этих случаях антагонистом аденозина [27, 55]. Теофиллин в отличие от некоторых других ингибиторов фосфодиэстераз не ингибирует захват аденозина [69]. Помимо этого, теофиллин не является антагонистом реакций, вызываемых норэпинефрином, изопреналином и панаверином, гистамином, а также простагландинами, что, по-видимому, свидетельствует об его специфичности в отношении рецепторов аденозина [16, 43, 76, 93].

Другие метилксантины обладают различными свойствами. Так, например, изобутилметилксантин является более эффективным антагонистом, чем кофеин, при действии на мозговые срезы морских свинок, но не превышает эффективность теофиллина [69]. Теобромин не служит эффективным антагонистом по крайней мере в трахее [29, 30], тогда как аминофиллин таким свойством отличается [1, 14]. Эффективными блокирующими агентами не являются также положительно или отрицательно заряженные аналоги теофиллина, теофиллин-7-уксусная кислота, третичный амин — этаминофиллин или четвертичный амин — йодметиламиноэтилтеофиллин [3].

## P2-пуринорецепторы

Для эффектов, вызываемых действием адениннуклеотидов на P2-рецепторы и не подверженных влиянию метилксантинов, специфических конкурентных блокирующих лекарств пока не обнаружено. Однако сообщалось, что некоторые агенты оказывают определенное избирательное действие на эти эффекты. К таким соединениям относятся хинидин [6, 17, 22, 24, 48, 68, 97, 106] двузамещенные имидазолиновые соединения типа антазолина и фентоламина в высоких концентрациях [87, 90, 103], а также 2'-диширидилизатоген [98, 99].

## АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА И ЦАМФ

### P1-пуринорецепторы

Существуют основания полагать, что эффекты пуриновых нуклеотидов, которые блокируются при действии метилксантинов, связаны с активацией аденилатциклазы, ведущей к изменению

уровней цАМФ во многих нейрональных и не нейрональных клетках [16, 27, 33, 44, 55, 57, 67, 72, 79, 80, 92]. Кроме того, предполагается, что аденилатциклазная система для адениннуклеотидов и нуклеозидов является специфической и не зависит от аденилатциклазной рецепторной системы, известной для гистамина, норэпинефрина, серотонина и простагландина Е [55, 56, 63, 92, 95]. Как предполагалось, пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды взаимодействуют с аденилатциклазными рецепторами на гладкой мышце, что ведет к повышению уровней цАМФ [5, 85], хотя другие исследователи это и отрицают [52, 70]. Многие из существующих разногласий могут быть разрешены благодаря признанию существования двух типов пуринергических рецепторов, один из которых, а именно P1, ведет к изменению уровня цАМФ, а другой — P2 — не ведет.

### ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТАГОНИСТОВ

Имеются достаточные основания для разделения пуринергических рецепторов по относительной эффективности действия на них АТФ, АДФ, АМФ и аденозина, подобно тому как рецепторы катехоламинов подразделяются на два типа,  $\alpha$ - и  $\beta$ -, на основании относительной эффективности действия на них эпинефрина, норэпинефрина и изопреналина [2].

#### P1-пуринорецепторы

Для чувствительных к теofilлину рецепторов в трахее [29, 39], мозге [67, 83] и клетках астроцитомы [27] относительная эффективность названных агентов располагается согласно ряду  $АД \geq АМФ > АДФ \geq АТФ$ , хотя и имеются сведения о некоторых отклонениях относительно этой основной закономерности [42].

#### P2-пуринорецепторы

Для чувствительных к хинидину рецепторов в кишечнике [17, 22], мочевом пузыре [24] и матке [42] последовательность относительных эффективностей имеет обратный вид:  $АТФ \geq АДФ > АМФ \geq АД$ .

Сообщалось, что в некоторых тканях, например в мозге и сердце, все перечисленные эффекторы обладают одинаковой действенностью [92, 10, 11]. Отмеченные вариации в чувствительности тканей могут отражать различную плотность расположения в разных тканях этих двух типов рецепторов. Другим осложняющим фактором является быстрое разрушение АТФ и АДФ до аденозина [53, 78] и захват аденозина (но не АТФ, АДФ или инозина) пуринергическими нервами и другими клетками, так что истинная последовательность эффективностей может быть выявлена лишь в экспериментах на изолированных органах [29, 89]. Подобно ситуа-

ции с адренорецепторами действие аденильных соединений по вызыванию сокращения или расслабления гладкой мышцы не обязательно должно отражать наличие рецепторов разного типа [20].

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ P1- И P2-ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ

Известные данные о распределении P1- и P2-пуринорецепторов в различных тканях приведены в табл. 8. Однако, поскольку

Таблица 8

	P1	P2
Расширение сосудов	Мозг* Сердце Легкие Скелетные мышцы	Почки Сердце?
Сужение сосудов	Почки	Легкие
Расслабление	Трахея* Мочевой пузырь Кишечник Желудок*	Кишечник Желудок Матка? Бронхолюы?
Сокращение	Матка Бронхолюы	Трахея Мочевой пузырь Дистальный отдел тонкой кишки Кишечник нижних позвоночных
Возбуждение	Желудочек	
Ингибирование Пресинаптическое ингибирование Ингибирование	Предсердие Холинэргические нервы* Адренэргические нервы* Мозговые нейроны Мозжечковые нейроны	Целое сердце?

\* Действие АТФ может определяться его гидролизом до аденозина.

предположение о наличии двух типов пуринергических рецепторов выдвинуто недавно, возможно существование многих пробелов и, несомненно, имеющиеся данные могут подвергнуться определенным уточнениям. Тем не менее некоторые основные тенденции очевидны. Так, например, P1-рецепторы, по-видимому, доминируют в сердечно-сосудистом русле, трахее и мозге, тогда как P2-рецепторы более характерны для желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы.

Кажущейся аномалией в анализе распределения пуринорецепторов является факт блокирования некоторых эффектов АТФ метилксантинами, например, в мозге и трахее, где доминируют

P1-рецепторы. Тем не менее тщательный анализ временных эффектов действия агонистов и образования цАМФ показывает, что АТФ действует в этих случаях своего гидролиза до аденозина.

### ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И АКТИВНОСТИ, ХАРАКТЕРНАЯ ДЛЯ P1- И P2-ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ

Наличие свободной NH<sub>2</sub>-группы в положении C<sub>6</sub> имидазольного кольца важно для обоих типов рецепторов, поскольку введение алкильных или диалкильных заместителей в NH<sub>2</sub>-группу понижает активность до 5% от исходной и инозин в этом случае обладает малой фармакологической активностью [22, 46, 92, 93, 101]. Рибозная группа также представляется необходимой для обоих типов рецепторов, поскольку аденин неактивен и, кроме того, существенной является пространственная конфигурация обоих пуриновых и рибозных колец [50].

#### P1-пуринорецепторы

Действие аденозина на блокированный метилксантином P1-пуринорецептор является резко структурнозависимым. Его активность как агониста повышается при введении некоторых заместителей в систему пуринового кольца. Так, например, двузамещенный аналог аденозина — 2-хлораденозин — представляет собой очень эффективный агонист в мозге [56, 81, 100] и сосудах сердца [28]. Агонистическое действие превращается в антагонистическое даже при самых незначительных замещениях в системе рибозного кольца. Так, 2'-, 3'- и 5'-деоксаденозины представляют собой мощные антагонисты при полном отсутствии агонистической активности в мозге [67, 69, 92], сердце [55] и кишечнике [3]. Phillis и Kostopoulos [82] предположили, что рецептор корковых нейронов мозга (P1) обладает специфичностью по отношению и к рибозной и к основной частям молекулы.

#### P2-пуринорецепторы

Изучение взаимосвязи структуры и активности P2-пуринорецепторов в кишечнике выявило несколько особенностей, отличающих их от рецепторов мозга и сердца [20, 9]. В частности, соединения с напряженной цепью фосфатной группы или соединения, в которых метиленовые заместители придают фосфатной цепи повышенную стойкость против ферментативного гидролиза, являются более эффективными, чем АТФ в вызывании расслабления гладкой мышцы кишечника [41, 47, 91]. Соединения, содержащие более одной фосфатной группы, вызывают быстрое расслабление в *taenia coli*; это не относится, однако, к  $\alpha$ -,  $\beta$ -метилензамещенным нуклеотидам, для которых время достижения максимального расслабления по меньшей мере на 40% больше.

Замещение пуриновых колец в положении 2 хлором или метилтиогруппой заметно повышает относительную активность ди- и трифосфатов.

### Пострецепторные эффекты пуриновых соединений

При изучении механизма расслабления под действием АТФ было показано, что она ведет к специфическому повышению калиевой проводимости, вызывающей в свою очередь гиперполяризацию, прекращение спонтанного спайка и последующее расслабление [8, 60, 103]. Что касается механизма сокращения под действием АТФ, то было высказано предположение, что в этом случае рецепторы демонстрируют способность комплексовать магний, присутствующий в клеточной мембране. Это облегчает вход кальция и последующее сокращение [34]. Повышение величины отношения  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  в перфузионной жидкости усиливает сокращение в ответ на действие АТФ в изолированной почечной артерии крыс [54, 59].

### ВЛИЯНИЕ P1- И P2-АНТАГОНИСТОВ НА РЕАКЦИИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ НЕРВОВ И ПРИ ГИПОКСИИ

Относительные эффекты P1- и P2-антагонистов на реакции различных тканей, возникающие в ответ на стимуляцию пуринергических нервов и на гипоксию, могут указывать на природу трансмиттера, участвующего в этих реакциях. В табл. 9 и 10 приведены имеющиеся экспериментальные данные. Полученные результаты показывают, что скорее АТФ, а не аденозин служит в качестве трансмиттера, выделяющегося из пуринергических нервов, в *taenia coli* и мочевом пузыре, тогда как аденозин яв-

Т а б л и ц а 9

	Стимуляция пуринергического нерва	АТФ	Аденозин
<i>Taenia coli</i>	Расслабление	Расслабление	Расслабление
P1-антагонист	—	—	Блокада
P2-антагонист	Блокада	Блокада	—
Мочевой пузырь	Сокращение	Сокращение	Расслабление
P1-антагонист	—	—	Блокада
P2-антагонист	Блокада	Блокада	—
Трахея	Расслабление	Сокращение (за которым следует расслабление)	Расслабление
P1-антагонист	Блокада	Сокращение, расслабление, блокада	Блокада
P2-антагонист	—	Сокращение, блокада, расслабление	—

Таблица 10

	Реакция на гипоксию	АТФ	Аденозин
Легочное кровообращение P1-антагонист	Сужение	Сужение	Расширение
Коронарное кровообращение P1-антагонист	—	—	Блокада
	Расширение	Расширение	Расширение
	—	—	Блокада

ляется, по-видимому, таким же пуринергическим трансмиттером в трахее. Первичные реакции коронарного и легочного кровообращения на гипоксию, по-видимому, связаны с АТФ, а не с аденозином, как предполагали ранее; однако пока остается неясным, выделяется ли АТФ из пуринергических нервов или из мышц [21].

#### АКТИВАЦИЯ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ И СИНТЕЗ ПРОСТАГЛАНДИНОВ

Открытие того факта, что АТФ является мощным стимулятором синтеза простагландинов [74], привело Burnstock и др. [23] к предположению, что АТФ, выделившийся из пуринергических нервов, может быть связан с простагландинами в процессе функционирования перистальтических и, возможно, других физиологических регуляторных механизмов. С тех пор уже появилось несколько примеров этой взаимосвязи в пищевом тракте [64], трахее [65], мочевом пузыре [61], и матке [36]. Недавно было показано, что ультрафиолетовое облучение с длинами волны в интервале 340—360 нм имитирует реакции АТФ и пуринергических нервов в *taenia coli* морских свинок, а ингибитор синтеза простагландинов — индометацин — блокирует сократительную реакцию, которая появляется вслед за остановкой этих реакций [25]. Было высказано предположение, что ультрафиолетовое облучение может дать уникальную возможность выяснения химии пуринергического рецептора [20].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенная в настоящем разделе гипотеза, что пуринергические рецепторы могут быть подразделены на P1- и P2-пуринорецепторы, несомненно нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении, прежде чем может быть окончательно принята или отвергнута. Тем не менее можно полагать, что такое предположение укажет направление дальнейших исследований в быстро развивающейся области и, в частности, приведет к созданию лекарств, пригодных для терапевтического использования с целью

модификации внеклеточной активности пуриновых нуклеотидов и нуклеозидов, участвующих в функционировании регуляторных физиологических механизмов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Afonso S.* Inhibition of coronary vasodilating action of dipyridamole and adenosine by aminophylline in the dog. — *Circ. Res.*, 1970, 26, 743—754.
2. *Ahlquist R. P.* A study of the adrenotropic receptors. — *Am. Physiol.*, 1948, 153, 586—600.
3. *Ally A. I., Nakatsu K.* Adenosine inhibition of isolated rabbit ileum and antagonism by theophylline. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, 199, 208—215.
4. *Amer M. S., Kreighbaum W. E.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Properties, activators, inhibitors, structure-activity relationships, and possible role in drug development. — *J. Pharm. Sci.*, 1975, 64, 1—37.
5. *Andersson R. G. G.* Cyclic AMP and calcium ions in mechanical and metabolic responses of smooth muscles; influence of some hormones and drugs. — *Acta Physiol. Scand.*, 1972, 85 Suppl. 382, 1.
6. *Arulappu R. G. S.* The actions of nucleic acid derivatives on smooth muscle. Fellowship thesis, Pharmaceutical Society of Victoria, Melbourne, 1967.
7. *Arunlakshana O., Schild H. O.* Some quantitative uses of drugs antagonists. — *Br. J. Pharmacol.*, 1959, 14, 48—58.
8. *Bennett M., Burnstock G., Holman M. E.* The effect of potassium and chloride ions on the inhibitory potential recorded in the guinea-pig taenia coli. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1963, 169, 33—34.
9. *Berne R. M.* Regulation of coronary flow. — *Physiol. Rev.*, 1964, 44, 1—29.
10. *Berne R. M., Rubio R., Curnish R. R.* Release of adenosine from ischaemic brain: Effect on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides. — *Circ. Res.*, 1974, 35, 262—271.
11. *Berne R. M., Rubio R., Dobson J. C., Curnish R. R.* Adenosine and adenine nucleotides as possible mediator of cardiac and skeletal muscle blood flow regulation. — *Circ. Res.*, 1971, 28 and 29 Suppl. 1, 115—131.
12. *Berthet J., Sutherland E. W., Rall T. W.* The assay of glucagon and epinephrine with use of liver homogenates. — *J. Biol. Chem.*, 1957, 229, 351—361.
13. *Bianchi C. P.* The effect of caffeine on radiocalcium movement in frog sartorius. — *J. Gen. Physiol.*, 1961, 44, 845—858.
14. *Bittar N., Pauly T. J.* Myocardial reactive hyperemia responses in the dog after aminophylline and lidoflazine. — *Am. J. Physiol.*, 1971, 220, 812—815.
15. *Black J. W., Duncan W. A. M., Durant C. J., Ganellin C. R., Parsons E. M.* Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. — *Nature*, 1972, 236, 385—390.
16. *Blume A. J., Dalton C., Sheppard H.* Adenosine-mediated elevation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate concentrations in cultured mouse neuroblastoma cells. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3099—3102.
17. *Bowman W. C., Hall M. T.* Inhibition of rabbit intestine mediated by alpha- and beta-adrenoceptors. — *Br. J. Pharmacol.*, 1970, 38, 399—415.
18. *Burnstock G.* Purinergic nerves. — *Pharmacol. Rev.*, 1972, 24, 509—581.
19. *Burnstock G.* Purinergic transmission. — In: *Handbook of Psychopharmacology*, v. 5, ed. by L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. H. Snyder, 1975, pp. 131—194. Plenum Press, New York.
20. *Burnstock G.* Purinergic "receptors". — *J. Theoret. Biol.*, 1976, 62, 491—503.
21. *Burnstock G.* Cholinergic and purinergic regulation of blood vessels. — In: *Handbook of Physiology (Vascular Smooth Muscle)*, ed. by D. Bohr, M. D. Somlyo, H. V. Sparks, 1978. American Physiological Society — Williams and Wilkins, Baltimore.
22. *Burnstock G., Campbell G., Satchell D. G., Smythe A.* Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance



- released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. — *Br. J. Pharmacol.*, 1970, 40, 668—688.
23. *Burnstock G., Cocks T., Paddle B. M., Staszewska-Barczak J.* Evidence that prostaglandin is responsible for the "rebound contraction" following stimulation of non-adrenergic, noncholinergic ("purinergic") inhibitory nerves. — *Eur. J. Pharmacol.*, 31, 360—362.
  24. *Burnstock G., Dumsday B. H., Smythe A.* Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. — *Br. J. Pharmacol.*, 1972, 44, 451—461.
  25. *Burnstock G., Wong H.* Comparison of the effects of UV light and purinergic nerve stimulation of the guinea-pig taenia coli. — *Br. J. Pharmacol.*, 1978, 62, 293—302.
  26. *Butcher R. W., Sutherland E. W.* Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterise adenosine 3',5'-phosphate in human urine. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 4244.
  27. *Clark R. B., Gross R., Su Y. F., Perkins J. P.* Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate content in human astrocytoma cells by adenosine and adenine nucleotides. — *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 5296—5303.
  28. *Cobbin L. B., Einstein R., Maguire M. H.* Studies on the coronary dilator actions of some adenosine analogs. — *Br. J. Pharmacol.*, 1974, 50, 25—33.
  29. *Coleman R. A.* A non-adrenergic inhibitory nervous response in the trachea of the guinea-pig. — *M. Inst. Biol. thesis*, 1976, University of London.
  30. *Coleman R. A.* Effects of some purine derivatives on guinea-pig trachea and their interaction with drugs that block adenosine uptake. — *Br. J. Pharmacol.*, 1976, 57, 51—57.
  31. *Curnish R. R., Berne R. M., Rubio R.* Effect of aminophylline on myocardial reactive hyperemia. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1972, 141, 593—598.
  32. *Dale H. H.* The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1914, 6, 147—190.
  33. *Daly J.* Role of cyclic nucleotides in the nervous system. — In: *Handbook of Psychopharmacology*, v. 5, ed. by L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. H. Snyder, 1975, pp. 47—107. Plenum Press, New York.
  34. *Daniel E. E., Irwin J.* On the mechanism whereby certain nucleotides produce contractions of smooth muscle. — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1965, 43, 89—136.
  35. *De Gubareff T., Sleator W.* Effects of caffeine on mammalian atrial muscle, and its interaction with adenosine and calcium. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1965, 148, 202—214.
  36. *Dozi-Vassiliades J., Tsiamitas C., Kokolis N.* The effect of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>ALPHA on the response of guinea-pig myometrium to adenine nucleotides in vitro. — *Prostaglandins*, 1976, 12, 515—524.
  37. *Drury A. N., Szent-Györgyi A.* The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1929, 68, 213—237.
  38. *Fain J. N., Weiser P. B.* Effects of adenosine deaminase on cyclic adenosine monophosphate accumulation, lipolysis, and glucose metabolism of fat cells. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 1027—1034.
  39. *Farmer J. B., Farrar D. G.* Pharmacological studies with adenine, adenosine and some phosphorylated derivatives on guinea-pig tracheal muscle. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1976, 28, 748—752.
  40. *Flamm E. S., Viau A. T., Ransohoff J., Naftchi N. E.* Experimental alterations in cyclic adenosine monophosphate concentrations in the cat basilar artery. — *Neurology*, 1976, 26, 664—666.
  41. *Gaddum J. H., Holtz P.* The localisation of the action of drugs on the pulmonary vessels of dogs and cats. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1933, 77, 139—158.
  42. *Gillespie J. H.* The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1934, 80, 345—359.

43. *Gilman A. G., Nirenberg M.* Regulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate metabolism in cultured neuroblastoma cells. — *Nature*, 1971, 234, 356—358.
44. *Gilman A. G., Schrier B. K.* Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate in foetal rat brain cell cultures. I. Effect of catecholamines. — *Mol. Pharmacol.*, 1972, 8, 410—416.
45. *Ginsborg B. L., Hirst G. D. S.* The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1972, 224, 629—645.
46. *Ginsborg B. L., Hirst G. D. S., Maizels J. V., Walker J.* Specificity of adenosine on transmitter output at neuromuscular junctions. — *Br. J. Pharmacol.*, 1973, 47, 637.
47. *Gough G. R., Maguire M. H., Satchell D. G.* Three new adenosine triphosphate analogs. Synthesis and effects on isolated gut. *J. Med. Chem.*, 1973, 16, 1188—1190.
48. *Green H. N., Stoner H. B.* Biological Actions of the Adenine Nucleotides, 1950, Lewis, London.
49. *Haddy F. J., Scott J. B.* Metabolically linked vasoactive in local regulation of blood flow. — *Physiol. Rev.*, 1968, 48, 688—707.
50. *Hahn F. E., Olsson R. A.* Relationship between structure and coronary vasodilatory activity in the adenosine series. — *The Pharmacologist*, 1975, 17, 382.
51. *Hedqvist P., Fredholm B. B.* Effects of adenosine on adrenergic neurotransmission — prejunctional inhibition and postjunctional enhancement. — *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1976, 293, 217—223.
52. *Herlihy J. T., Bockman E. L., Berne R. M., Rubio R.* Adenosine relaxation of isolated vascular smooth muscle. — *Am. J. Physiol.*, 1976, 230, 1239—1243.
53. *Hopkins S. V.* The action of ATP in the guinea-pig heart. — *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 335—339.
54. *Hrdina P. D., Bonaccorsi A., Benvenuti F.* Role of  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$  in contractile effect of ATP on isolated perfused renal artery. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1970, 12, 249—252.
55. *Huang M., Drummond G. I.* Effect of adenosine on cyclic AMP accumulation in ventricular myocardium. — *Biochem. Pharmacol.*, 1976, 2713.
56. *Huang M., Shimizu H., Daly J. W.* Accumulation of cyclic adenosine monophosphate in incubated slices of brain tissue. 2. Effects of depolarising agents, membrane stabilisers phosphodiesterase inhibitors, and adenosine analogs. — *J. Med. Chem.*, 1972, 15, 462—466.
57. *Iizuka H., Adachi K., Halprin K. M., Levine V.* Adenosine and adenine nucleotides stimulation of skin (epidermal) adenylate cyclase. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, 444, 685—693.
58. *Isaacson A., Sandow A.* Quinine and caffeine effects on calcium movements in frog sartorius muscle. — *J. Gen. Physiol.*, 1967, 50, 2109—2128.
59. *Iso T.* Relationship between pharmacological actions of ATP and biochemical parameters in microsomes from various fibres of guinea-pig. — *Jpn. J. Pharmacol.*, 1974, 24, 641—642.
60. *Jager L. P.* The effect of catecholamines and ATP on the smooth muscle cell membrane of the guinea-pig taenia coli. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1974, 25, 372—382.
61. *Johns A., Paton D. M.* Effect of indomethacin on atropine resistant transmission in rabbit and monkey urinary bladder — evidence for involvement of prostaglandins in transmission. — *Prostaglandins*, 1977, 13, 245—254.
62. *Johnson P. N., Inesi A.* The effect of methylxanthines and local anaesthetics on fragmented sarcoplasmic reticulum. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1969, 169, 308—314.
63. *Kakiuchi S., Rall T. W., McIlwain H.* The effect of electrical stimulation upon the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in isolated cerebral tissue. — *J. Neurochem.*, 1969, 16, 485—491.
64. *Kamikawa Y., Serizawa K., Mizutani M., Shimo Y.* Responses to adenosine 5'-triphosphate (ATP) of esophageal and gastrointestinal smooth muscles of guinea-pig. — *Jpn. Pharmacol.*, 1976, 26, 61.

65. *Kamikawa Y., Shimo Y.* Pharmacological differences of non-adrenergic inhibitory response and of ATP-induced relaxation in guinea-pig tracheal strip chains. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1976, 28, 854—855.
66. *Kiernan J. A.* The involvement of mast cells in vasodilatation due to axon reflexes in infused skin. — *Quart. J. Exp. Physiol.*, 1972, 57, 311—317.
67. *Kuroda Y., Saito M., Kobayashi K.* Concomitant changes in cyclic AMP level and postsynaptic potentials of olfactory cortex slices induced by adenosine derivatives. — *Brain Res.*, 1976, 109, 196—201.
68. *Madinaveitia J., Raventos J.* Antimalarial compounds as antagonists of adenosine. — *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 1949, 4, 81—92.
69. *Mah H. D., Daly J. W.* Adenosine dependent formation of cyclic AMP in brain slices. — *Pharmacol. Rev.*, 1976, 8, 65—79.
70. *McKenzie S. G., Frew R., Bär H.* Effects of adenosine and related compounds on adenylate cyclase and cyclic AMP levels in smooth muscle. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1977, 41, 193—203.
71. *Mentzer R. M., Rubio R., Berne R. M.* Release of adenosine by hypoxic canine lung tissue and its possible role in pulmonary circulation. — *Am. J. Physiol.*, 1975, 229, 1625—1631.
72. *Mills D. C. B., Smith J. B.* The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in platelets. — *Biochem. J.*, 1971, 121, 185—196.
73. *Moritoki H., Morita M., Kanbe T.* Effects of methylxanthines and imidazole on contractions of guinea-pig ileum induced by transmural stimulation. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1976, 35, 185—198.
74. *Needleman P., Minkes M. S., Douglas J. R.* Stimulation of prostaglandin biosynthesis by adenine nucleotides. Profile of prostaglandin release by perfused organs. — *Circ. Res.*, 1974, 34, 455—460.
75. *Oberdörster G., Lang R., Zimmer R.* Influence of adenosine and lowered cerebral blood flow on the cerebrovascular effects of theophylline. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1975, 30, 197—204.
76. *Okunasaba F. K., Hamilton J. T., Cook M. A.* Antagonism by methylxanthines of purine nucleotide-induced and dipyridamole-induced inhibition of peristaltic activity of the guinea-pig ileum. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1977, 43, 181—194.
77. *Osswald H.* Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs. — *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1975, 288, 79—86.
78. *Paddle B. M., Burnstock G.* Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilatation. — *Blood Vessels*, 1974, 11, 110—119.
79. *Peck W. A., Carpenter J. G., Schuster R. J.* Adenosine mediated stimulation of bone cell adenylate cyclase activity. — *Endocrinology*, 1976, 99, 901—909.
80. *Penit J., Huot J., Jard S.* Neuroblastoma cell adenylate-cyclase direct activation by adenosine and prostaglandins. — *J. Neurochem.*, 1976, 26, 265—273.
81. *Phillis J. W., Edstrom P.* Effects of adenosine analogs on rat cerebral cortical neurons. — *Life Sci.*, 1976, 19, 1041—1053.
82. *Phillis J. W., Kostopoulos G. K.* Adenosine as a putative transmitter in cerebral cortex — studies with potentiators and antagonists. — *Life Sci.*, 1975, 17, 1085—1094.
83. *Phillis J. W., Kostopoulos G. K., Limacher J. J.* Depression of corticospinal cells by various purines and pyrimidines. — *Can. J. Physiol.*, 1974, 52, 1226—1229.
84. *Phillis J. W., Kostopoulos G. K., Limacher J. J.* A potent depressant action of adenine derivatives on cerebral cortical neurons. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1975, 30, 125—129.
85. *Raberger G., Kraupp O., Strulinger W., Nell G., Chirikdjan J. J.* The effects of intracoronary infusion of adenosine on cardiac performance, blood supply and on myocardial metabolism in dogs. — *Pflugers Arch.*, 1970, 317, 20.
86. *Rall T. W., West T. C.* The potentiation of cardiac inotropic responses to noropinephrine by theophylline. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1963, 139, 269—274.

87. *Rikimaru A., Fukushi Y., Suzuki T.* Effects of imidazole and phentolamine on the relaxant responses of guinea-pig taenia coli to transmural stimulation and to adenosine triphosphate. — *Tohoku J. Exp. Med.*, 1971, 105, 199—200.
88. *Rubio R., Berne R. M.* Release of adenosine by normal myocardium in dogs and its relationship to regulation of coronary resistance. — *Circ. Res.*, 1969, 25, 407—415.
89. *Satchell D., Burnstock G.* Comparison of the inhibitory effects on guinea-pig taenia coli of adenine nucleotides and adenosine in the presence and absence of dipyridamole. — *Eur. J. Pharmacol.* 1975, 32, 324—328.
90. *Satchell D., Burnstock G., Dann P.* Antagonism of the effects of purinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on the guinea-pig taenia coli by 2-substituted imidazolines and related compounds. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1973, 23, 264—269.
91. *Satchell D. G., Maguire M. H.* Inhibitory effects of adenine nucleotide analogs on the isolated guinea-pig taenia coli. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975, 195, 540—548.
92. *Sattin A., Rall T. W.* The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-phosphate content of guinea-pig cerebral cortex slices. — *Mol. Pharmacol.*, 1970, 6, 13—23.
93. *Sawynok J., Jhammandas K. H.* Inhibition of acetylcholine-release from cholinergic nerves by adenosine, adenine-nucleotides and morphine — antagonism by theophylline. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, 197, 379—390.
94. *Schrader J., Rubio R., Berne R. M.* Inhibition of slow action potentials of guinea-pig atria by adenosine. — *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1975, 7, 427—433.
95. *Shimizu H., Creveling C. R., Daly J.* Stimulated formation of adenosine 3',5'-cyclic phosphate in cerebral cortex: Synergism between electrical activity and biogenic amines. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 65, 1033—1040.
96. *Shimizu H., Daly J. W., Creveling C. R.* A radioisotopic methods for measuring the formation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in incubated slices of brain. — *J. Neurochem.*, 1969, 16, 1609—1619.
97. *Sneddon J. D., Smythe A., Satchell D., Burnstock G.* An investigation of the identity of the transmitter substance released by non-adrenergic, non-cholinergic excitatory nerves supplying the small intestine of some lower vertebrates. — *Comp. Gen. Pharmacol.*, 1973, 4, 53—60.
98. *Spedding M., Sweetman A. J., Weetman D. F.* Antagonism of adenosine 5'-triphosphate-induced relaxation by 2,2'-pyridylisatogen in taenia of guinea-pig cecum. — *Br. J. Pharmacol.*, 1975, 53, 575—583.
99. *Spedding M., Weetman D. F.* Identification of separate receptors for adenosine and adenosine 5'-triphosphate in causing relaxations of isolated taenia of guinea-pig cecum. — *Br. J. Pharmacol.*, 1976, 57, 305—310.
100. *Sturgill T. W., Schrier B. K., Gilman A. G.* Stimulation of Cyclic AMP accumulation by 2-chloroadenosine: Lack of incorporation of nucleoside into cyclic nucleotide. — *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 1975, 1, 21—30.
101. *Sydow V., Ahlquist R. P.* Cardiovascular actions of some simple nucleic acid derivatives. — *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 1954, 43, 166—170.
102. *Ther L., Muschawek R., Hergott J.* Antagonismus zwischen Adenosin und Methyl-xanthinen am Reizleitungssystem des Herzens. — *Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.*, 1957, 231, 586—590.
103. *Tomita T., Watanabe H.* A comparison of the effects of adenosine triphosphate with noradrenaline and with the inhibitory potential of the guinea-pig taenia coli. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 231, 167—177.
104. *Triggle D. J., Triggle C. R.* *Chemical Pharmacology of the Synapse*. 1976, p. 654, Academic Press, New York.
105. *Verhaeghe R. H., Vanhoutte P. M., Shepherd J. T.* Inhibition of sympathetic neurotransmission in canine blood vessels by adenosine and adenine nucleotides. — *Circ. Res.*, 1977, 40, 208—215.
106. *Wayne E. J., Goodwin J. F., Stoner H. B.* Effects of adenosine triphosphate on electrocardiogram of man and animals. — *Br. Heart J.*, 1949, 11, 55—67.

# РЕЦЕПТОРЫ ГОРМОНОВ

## ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ОТ РЕЦЕПТОРОВ ГОРМОНОВ К АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЕ — ОБЗОР ДАННЫХ И ГИПОТЕЗЫ

ЭРНСТ ДЖ. М. ХЕЛМРЕЙХ, ТОМАС ПФЕЙФФЕР  
(ERNST J. M. HELMREICH, THOMAS PFEUFFER)

*Отдел физиологической химии, Университет Вюрцбурга,  
8700 Вюрцбург, ФРГ*

### ВВЕДЕНИЕ

Попытки выяснить молекулярную структуру мембраносвязанного и гормонально-регулируемого аденилатциклазного комплекса с целью понимания механизма передачи сигнала от рецептора гормонов к аденилатциклазе начали предприниматься лишь в самое последнее время, но некоторые достижения в этой области уже заслуживают внимания. Orly и Schramm [16] показали, что  $\beta$ -адренергический рецептор и аденилатциклазная активность могут быть разделены. В процессе этого эксперимента авторы инактивировали каталитическую активность аденилатциклазы эритроцитов индюшки действием N-этилмалеимида или нагреванием, после чего такие клетки были использованы в качестве источника для выделения  $\beta$ -рецепторов. Эритроциты с инактивированной аденилатциклазой были затем слиты с помощью вируса Сендай с эритролейкемическими клетками Фрейнда (Ф-клетки), которые содержали аденилатциклазу, но не имели  $\beta$ -адренергических рецепторов. Тени препаратов слитых клеток обладали зависимой от изопротеренола аденилатциклазной активностью. Таким образом,  $\beta$ -рецептор и аденилатциклаза представляют собой два различных индивидуальных белка, кодируемых, по-видимому, разными генами [9]. Приводимые здесь результаты представляют особый интерес в этом контексте, поскольку они показывают, что в мембранах эритроцитов голубя белок (или белки), ответственный за активацию аденилатциклазы под действием гуанили nucleотида, также представляет собой индивидуальный компонент, который может быть отделен от аденилатциклазы [6, 18, 19]. Pfeuffer показал, что аденилатциклазный комплекс, солибилизованный с помощью луброла РХ из мембран эритроцитов голубя, инактивируется при адсорбции белковой фракции на аффинном сорбенте — ГТФ-сефарозе [18]. Фракция белка, содержащая центры связывания для гуанили nucleотида, с помощью такой аффинной хроматографии может быть отделена от белка, который не удерживается аффинной колонкой и функции которого пока еще не определены. При последующей рекомбинации обеих фракций в значительной степени восстанавливается стимулируемая как гуанили nucleотидом, так и фторидом активность растворимого препарата (см. табл. 11, 12). По нашим данным, менее 5% связывающих

центров для гуанилнуклеотида в мембране эритроцита голубя действительно функционируют в процессе активации аденилатциклазы.

Ранее мы интерпретировали квазиобратимую активацию стимулируемой катехоламинами аденилатциклазы мембран эритроцитов птиц в присутствии аналогов ГТФ (например,  $Gpp(NH)p$ ,  $Gpp(CH_2)p$  и  $GTP-\gamma-S$ ) как нефизиологическое следствие метаболической стабильности этих соединений [7, 19]. Поскольку эти аналоги связываются по тем же центрам, что и природный активатор ГТФ, высказано предположение о действии этих соединений, подобно аналогам переходного состояния, которые в отличие от ГТФ не способны гидролизироваться и, следовательно, восстанавливать действенность активного центра [19]. Это привело нас к заключению, что ГТФ-азная активность принадлежит регуляторной субъединице, связывающей гуанилнуклеотид [7, 19]. Эта гипотеза получила недавно подтверждение в работе Cassel и Selinger, которые продемонстрировали существование в мембранах эритроцитов индюшки стимулируемой катехоламинами ГТФ-азы, тесно ассоциированной с аденилатциклазой [2]. В настоящем разделе мы пытаемся свести воедино все имеющиеся факты в рамках модели гормонально-стимулируемого аденилатциклазного комплекса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Экспериментальные приемы детально изложены в оригинальных работах [18—20], поэтому мы приводим только краткое описание процедуры аффинной хроматографии. Дополнительная информация дана в таблицах 11 и 12.

### Аффинная хроматография на ГТФ-сефарозе

Использованная нами аффинная матрица представляет собой сефарозу-4В — NH —  $(CH_2)_3$  — CO — NH — Vz — NH — pppG [18]. Аденилатциклазу переводили в раствор из мембран действием луброла РХ после предварительной обработки мембран 1 мМ ГМФ и 50 мкМ D, L-изопротеренолом [19]. Растворимый препарат добавляли к ГТФ-сефарозе и после инкубации при комнатной температуре смесь разделяли центрифугированием на супернатант (фракция I) и связанный с матрицей компонент (фракция II). Связанный с матрицей компонент промывали и ресуспендировали в буферном растворе, содержащем  $Gpp(NH)p$  или ГТФ, что приводило к высвобождению адсорбированных белков и получению белоксодержащего супернатанта (фракция III).

Для реактивации супернатант I смешивали с супернатантом III и активность аденилатциклазы определяли немедленно после смешивания. При измерении степени активации под действием гуанилнуклеотида в систему добавляли  $Gpp(NH)p$ , а при определении степени активации под действием фторида в систему добав-

ляли ГТФ. Контрольные эксперименты проводили с немодифицированной сефарозой-4В и соответствующие смеси подвергали всем тем же манипуляциям, что и экспериментальные образцы. Смысл всей процедуры состоит в том, чтобы сделать измерения аденилатциклазной активности в супернатантах I и II количественно сравнимыми. Детали эксперимента описаны [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Разделение и реконструкция аденилатциклазы

Из табл. 11 видно, что обработка солюбилизируемой детергентом аденилатциклазы ГТФ-сефарозой приводит к снижению ее способности стимулироваться под действием нуклеотидов на 70% (эксперимент Б). В контроле при использовании немодифициро-

Таблица 11. Выделение и реконструирование аденилатциклазы

Препарат	Активность аденилатциклазы в присутствии		Концентрация белка, мкг·[200 мкл] <sup>-1</sup>
	Gpp(NH)p	фторида	
	нмоль·в мин <sup>-1</sup> ·[200 мкл] <sup>-1</sup>		
А. Аденилатциклаза, обработанная сефарозой-4В	65(±10) [100 %]	35(±5) [100 %]	50 [100 %]
Б. Аденилатциклаза, обработанная ГТФ-сефарозой	20(±4) [30 %]	17(±3) [48 %]	48(±0.5) [97 %]
В. Гуанилнуклеотидсвязывающий белок, удаленный с ГТФ-сефарозы с помощью Gpp(NH)p	2(±1) [3 %]	—	1.5(±0.5) [3 %]
Г. Смешанный препарат Б и В	45(±7) [69 %]	—	—
Д. Гуанилнуклеотидсвязывающий белок, удаленный с ГТФ-сефарозы с помощью ГТФ	—	0.7(±0.5) [2 %]	—
Е. Смешанный препарат Б и Д	—	29(±5) [83 %]	—

Примечание. Активность аденилатциклазы измеряли в образце объемом 200 мкл, содержащем или 0,1 мМ Gpp(NH)p, или 0,2 мМ ГТФ и 10 мМ NaF. Активность приведена в наномолях образовавшегося цАМФ в минуту, концентрации белка дана в микрограммах на 200 мкл. Значения представляют собой среднее±ошибка среднего. В каждом случае на разных препаратах выполнили 2—15 экспериментов. Процент активности относительно контроля дан в скобках (контроль — препарат А). Детали см. [18]. Эксперименты описаны в "Experimental Methods".

ванной сефарозы-4В соответствующая активность не теряется (эксперимент А). Поскольку фторидная активация растворимой аденилатциклазы, полученной из обработанных ГМФ и изопротеренолом мембран эритроцитов голубя, усиливается под действием ГТФ [18], потеря стимулируемой фторидом активности при обработке препарата ГТФ-сефарозой частично может происходить вследствие удаления из препарата гуанилнуклеотидсвязывающих белков, медирующих ГТФ-зависимую активацию (эксперимент Б). Таким образом, различия в стимулируемой фторидом активности контрольного и экспериментальных образцов сильно зависят от степени активации контрольного образца под действием ГТФ (сравните эксперименты А и Б). Связывание гуанилнуклеотидов и активация являются процессами, зависящими от времени и температуры [24]. С учетом этого различные стадии процесса аффинной хроматографии проводили при комнатной температуре. Более того, время взаимодействия было выбрано достаточно длительным для превращения аденилатциклазы в максимально активное состояние, которое было достаточно стабильным для получения при анализе аденилатциклазной активности линейных зависимостей в течение по меньшей мере 20 мин при 37°С.

Специфичность ГТФ-сефарозы для центров связывания гуанилнуклеотидов становится очевидной из эксперимента с 0,1 мМ Gpp(NH)p, который предотвращает присоединение связывающих белков [18]. В других контрольных экспериментах было показано, что соответствующее производное вещество АТФ-сефарозы не удаляет из системы белки, необходимые для проявления аденилатциклазной активности; точно так же белки, связанные с ГТФ-сефарозой, не удаляются с нее при обработке App(NH)p [18]. Активность растворимой аденилатциклазы в значительной степени зависит от отношения детергента к белкам и липидам. Отщепление белка от аффинной матрицы под действием Gpp(NH)p (и ГТФ) требует присутствия детергента (0,6 мМ луброла) и нейтральной соли (0,1 М NaCl), однако ни NaCl, ни луброл по отдельности или в смеси сами по себе неспособны отщеплять белки от ГТФ-сефарозы [18]. Исходный растворимый материал (препарат А в табл. 11) содержал 220 пмоль Gpp(NH)p на 1 мг белка, тогда как препарат В связывал 1000—1600 пмоль Gpp(NH)p на 1 мг белка; при этом обнаруживалось 5—8-кратное увеличение числа связывающих центров в результате аффинной хроматографии.

Эксперименты (Г и Е) по реконструкции отчетливо показывают, что фракция, связанная с ГТФ-сефарозой, должна представлять собой важный компонент аденилатциклазной системы, поскольку ее присутствие необходимо для реактивации. Эксперименты по реактивации без использования трипсина или N-этилмаленимида (результаты этих экспериментов в табл. 11 не приведены) показали, что фракции, связанные с матрицей, и соединения, не удерживаемые производным сефарозы, представляют собой белки, чувствительные по отношению к сульфгидрильным



реагентам [18]. Сообщалось также, что стимуляция аденилатциклазы фторидом и связывание аденилатциклазой гуанилнуклеотида с последующей активацией фермента являются процессами, чувствительными к действию сульфгидрильных реагентов [17, 22]. Реактивация не происходит, если фракцию Б предварительно выдержать при температуре  $45^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч или если фракцию В смешать с бычьим сывороточным альбумином или с солюбилизованными под действием луброла РХ мембранными белками крысиных эритроцитов, лишенных аденилатциклазной активности [18]. В других экспериментах [18] удален с матрицы связанный компонент, необходимый для реактивации, который был далее фракционирован центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Лишенная активности фракция содержала белки, необходимые для реактивации, как это следует из увеличения активности при ее рекомбинации с соединениями, не адсорбированными на ГТФ-сефарозе. Основным компонентом этой фракции представляет собой белок с молекулярной массой 42 000 дальтон. Небольшая остаточная активность связанных с матрицей компонентов (эксперименты В и Д в табл. 11) может быть отнесена за счет присутствия небольшого количества неразделенного голофермента. Мембраны, обработанные  $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$  и изопротеренолом, содержат значительное количество белка с молекулярной массой 23 000 дальтон, который также связывает гуанилнуклеотиды. Этот белок также был солюбилизован и выделен с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, но не обладал способностью к реактивации. Эти результаты указывают на фракцию с молекулярной массой 42 000 дальтон как на наиболее вероятного кандидата, ответственного за связывание гуанилнуклеотида и активацию. Однозначное доказательство зависит, однако, от того, насколько успешным окажется проводимое в настоящее время выделение этого мембранного белка в чистом виде.

### Синергическая активация гормонами и гуанилнуклеотидами

Гуанилнуклеотиды и гормоны активируют аденилатциклазу из различных источников синергически [19, 21, 23]. Мы обнаружили, что обработка интактных мембран D,L-изопротеренолом значительно повышает способность гуанилнуклеотидсвязывающих фракций, полученных из таких предварительно обработанных мембран, к реактивации (табл. 12). Реконструирование с использованием гуанилнуклеотидсвязывающих фракций из мембран, не обработанных изопротеренолом, дает лишь незначительную активность, даже когда другие, необходимые для реконструирования фракции, получены из гормонально-активированных мембран (препарат IV в табл. 12). Наоборот, гуанилнуклеотидсвязывающие фракции, полученные из гормонально-стимулированных мембран, при реконструировании приводят к формированию аде-

Таблица 12. Влияние D,L-изопротеренола на реактивацию аденилатциклазы

Препарат	Активированная Gpp(NH)p аденилатциклаза после добавления		
	буферного раствора	фракции, связывающей ГТФ (-изопротеренол)	фракции, связывающей ГТФ (+изопротеренол)
		пмоль·мин <sup>-1</sup> ·(200 мкл) <sup>-1</sup>	
I. Аденилатциклязный комплекс (-изопротеренол)	19 (±5)	—	—
II. Аденилатциклязный комплекс (+изопротеренол)	60 (±10)	—	—
III. Аденилатциклязная фракция (-изопротеренол)	4 (±1)	11 (±4)	41 (±7)
IV. Аденилатциклязная фракция (+изопротеренол)	7 (±1)	18 (±3)	38 (±9)

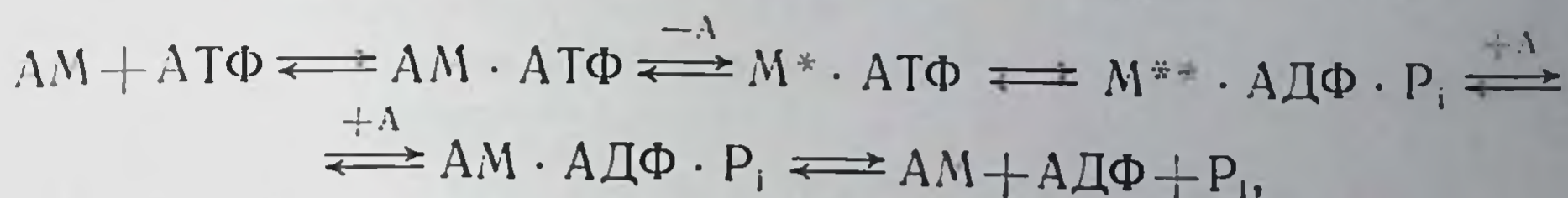
Примечание. Аденилатциклаза была солюбилизована из мембран эритроцитов голубя, преникубированных с ГМФ в присутствии или в отсутствие 50 мкМ D,L-изопротеренола. Солюбилизованный лубролом материал был обработан ГТФ-сефарозой, как описано в экспериментальной части [18]. Препараты I и II представляют собой нефракционированный комплекс, а препараты III и IV—аденилатциклязные фракции, освобожденные от ГТФ-связывающих белков обработкой на ГТФ-сефарозе. ГТФ-связывающие фракции представляют собой материал, элюированный с аффинной колонки при промывании 0,1 мМ Gpp(NH)p. Аликвоты препаратов или фракций аденилатциклазы смешивали с буфером или с аликвотами связывающих фракций. Активность измеряли в присутствии 0,1 мМ Gpp(NH)p и выражали в пикомолях на 1 мин на объем смеси. Аденилатциклязная активность ГТФ-связывающих фракций составляла 1,5 пмоль/мин на 200 мкл. Каждое значение представляет собой среднее четырех экспериментов ± стандартная ошибка. Приведено из [18] с разрешения "J. Biol. Chem."

нилатциклязного комплекса с большей активностью, даже когда фракции, не содержащие связывающих белков, получены из мембран, не активированных действием изопротеренола (препарат III в табл. 12). Это свидетельствует о наличии представляющей интерес взаимосвязи между рецептором гормона и гуанилцуклеотид-связывающей фракцией, которую еще предстоит установить.

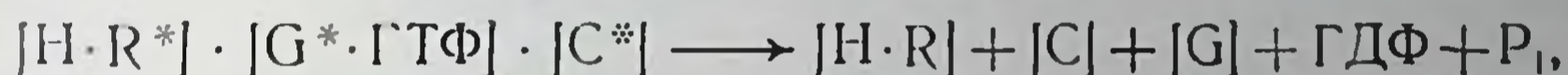
### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе мускульной активности АТФ выполняет двойную функцию: а) гидролизует при сокращении мышц и развитии напряжения; б) вызывает диссоциацию актомиозинового комплекса, разрушая связь между поперечными мостиками тяжелого меромиозина и волокнами актина, что вызывает расслабление мышц. Образование и разрыв поперечных мостиков регулируются ионом Ca<sup>2+</sup> и тропони-тропомиозиновой системой [8]. Недавние измерения с помощью быстрых кинетических методов показали

[1, 4, 14], что индуцированное субстратом конформационное изменение регулирует стационарную скорость гидролиза АТФ:



где  $\text{M}^*$  и  $\text{M}^{**}$  — конформеры миозина (M), обладающие различными флюоресцентными свойствами; AM — актомиозин; A — актин. Два момента представляются важными для обсуждения. Во-первых, этот механизм предполагает важную роль нуклеотида в «хемотронном превращении». Так, по крайней мере формально его роль должна быть подобна роли ГТФ в активации аденилатциклазы. Levitzki [11—13] допускает, что аденилатциклаза превращается в активную форму, когда по соответствующим местам связывания происходит присоединение как ГТФ, так и  $\beta$ -агониста. Поскольку аденилатциклаза обладает ГТФ-азной активностью, фермент вновь возвращается в неактивное состояние, как только ГТФ гидролизуется:



где  $[\text{R}^*]$  означает модифицированное состояние рецептора, возникающее после образования активных состояний аденилатциклазы  $[\text{C}^*]$  и ГТФ-азы  $[\text{G}^*]$ . Состояние  $\text{R}^*$  обладает меньшей аффинностью по отношению к  $\beta$ -агонистам [12, 15]. Существование ассоциации рецептора гормона с гуанилнуклеотидсвязывающим белком следует также из табл. 12 [18].

В мозге и других тканях ион  $\text{Ca}^{2+}$  активирует аденилатциклазу и фосфодиэстеразу цАМФ, связываясь с активаторным белком, который в яичках крыс может быть заменен тропонином С из скелетных мышц кролика [3]. В эритроцитах индюшки аденилатциклаза тормозится ионом  $\text{Ca}^{2+}$  [25]. Кроме того, катехоламины стимулируют выход  $\text{Ca}^{2+}$  в эритроцитах птиц и человека [26]. Levitzki [12] высказал догадку, что катехоламины могут снимать ингибирование аденилатциклазы за счет удаления связанного  $\text{Ca}^{2+}$  благодаря облегчению его выхода. Если это действительно так, не исключено, что кальциевая регуляция активности аденилатциклазы связана с сократительным аппаратом мембраны.

В попытке свести воедино все описанные наблюдения мы постулируем, что чувствительная к гормонам мембранная аденилатциклазная система многокомпонентная, построенная из нескольких гомологичных и гетерологичных субъединиц, способных к обратимому взаимодействию друг с другом. Минимальным структурным требованием является наличие гуанилнуклеотидсвязывающей субъединицы (G), рецептора гормона (R) и каталитической субъединицы аденилатциклазы (C). Подобно тому как это сделано для мышцы, взаимодействующие белки могут быть представлены как хемотронные преобразователи, и роль ГТФ в такой реакции сопряжения может заключаться в передаче сигнала

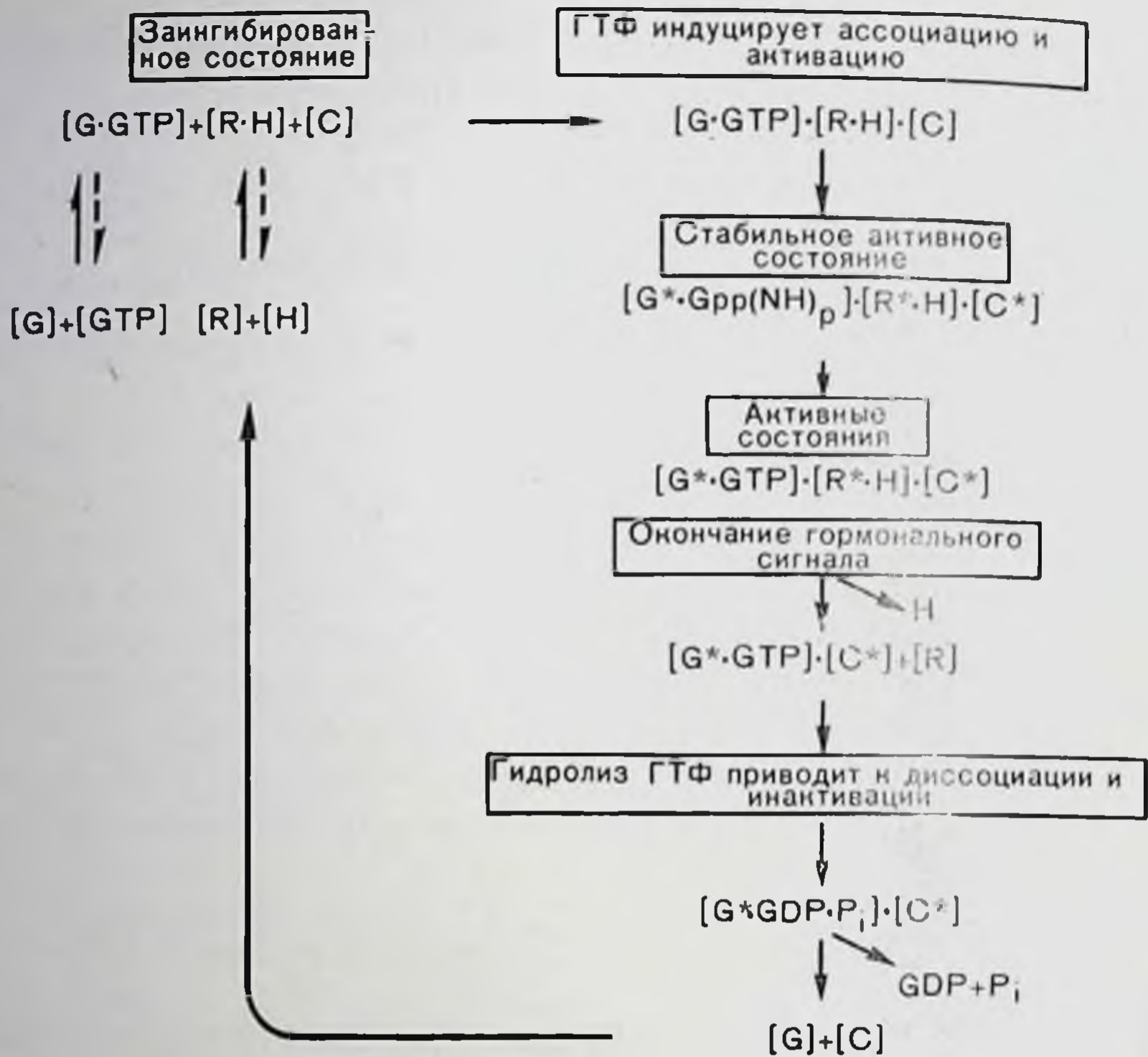


Рис. 27.

ла от рецептора гормона к аденилатциклазе, т. е. быть подобной роли АТФ в работе мышцы, за одним важным исключением: ГТФ в процессе активации аденилатциклазы способствует ассоциации, тогда как гидролиз ГТФ индуцирует диссоциацию и приводит к инактивации аденилатциклазы. В противоположность бифункциональному ГТФ монофункциональные негидролизуемые аналоги гуанилнуклеотиды вызывают постоянно активное состояние (рис. 27).

Известно, что последовательность перечисленных реакций и особенно их временные параметры являются чисто спекулятивными, поскольку не определены константы скоростей элементарных стадий процесса и не доказано существование постулированных промежуточных состояний. Кинетика процесса может быть правильно интерпретирована только после того, как будут охарактеризованы все компоненты аденилатциклазной системы. Более того, несомненно важное влияние липидного окружения на ассоциативно-диссоциативное равновесие взаимодействующих белков компонентов и соответствующие скорости вообще не рассматривается из-за полного отсутствия информации. Другими словами, предложенная гипотетическая схема преследует своей единственной целью указать основные направления дальнейших экспериментов. И действительно, необходимость некоторых вполне выполнимых опытов прямо вытекает из этой схемы. Так, например, становится очевидной необходимость точной локализации ГТФ-азной актив-

ности и экспериментов, которые должны ответить на вопрос, действительно ли эта активность располагается на том же белке, что и гуанилнуклеотидсвязывающий центр. Более того, хотелось бы знать, как именно взаимодействуют гуанилнуклеотидсвязывающий белок и рецептор гормона (см. табл. 12).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bagshaw C. R., Eccleston J. F., Eckstein F., Goody R. S., Gutfreund H., Trentham D. R. The magnesium ion-dependent triphosphatase of myosin. — *Biochem. J.*, 1974, 141, 351—364.
2. Cassel D., Selinger Z. Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1976, 452, 538—551.
3. Dedman J. R., Potter J. D., Means A. R. Biological cross-reactivity of rat testis phosphodiesterase activator protein and rabbit skeletal muscle troponin. — *C. J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 2437—2440.
4. Eccleston J. F., Geeves M. A., Trentham D. R., Bagshaw C. R., Mrwa U. The binding and cleavage of ATP in the myosin and actomyosin ATPase mechanisms. — In: *Molecular Basis of Motility: 26th Mosbach Colloquium*, ed. by L. M. G. Heilmeyer, Jr., J. C. Ruegg, Th. Wieland, 1975, pp. 42—52. Springer — Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
5. Helmreich E. J. M. Hormone-receptor interactions. — *FEBS Lett.*, 1976, 61, 1—5.
6. Helmreich E. J. M., Pfeuffer Th. Control of catecholamine stimulated adenylate cyclase in pigeon erythrocyte membranes by guanylnucleotides. — In: *Advances of Enzyme Regulation*, vol. 15, ed. by G. Weber, 1977, p. 209—220. Pergamon Press, Oxford, New York.
7. Helmreich E. J. M., Zenner H. P., Pfeuffer Th., Cori C. F. Signal transfer from Hormone receptor to adenylate cyclase. — In: *Current Topics in Cellular Regulation*, vol. 10, 1976, ed. by B. L. Horecker, E. R. Stadtman, p. 41—87. Academic Press, New York.
8. Huxley H. E. The structural basis of contraction and regulation in skeletal muscle. — In: *Molecular Basis of Motility; 26th Mosbach Colloquium*, ed. by L. M. G. Heilmeyer, Jr., J. C. Ruegg, Th. Wieland, 1975, p. 9—25. Springer — Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
9. Insel P. A., Maguire M. E., Gilman A. G., Bourne H. R., Coffino P., Melmon K. L.  $\beta$ -Adrenergic receptors and adenylate cyclase: Products of separate genes? — *Mol. Pharmacol.*, 1976, 12, 1062—1069.
10. Kimura H., Murad F. Localization of particulate guanylate cyclase in plasma membranes and microsomes of rat liver. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 4810—4817.
11. Levitzki A. Catecholamine receptores. — In: *Receptors and Recognition*, vol. 2, Ser. A., ed. by P. Cuatrecasas, M. F. Greaves, 1976, p. 199—229. Chapman and Hall, London.
12. Levitzki A. Catecholamine receptors. — In: *Reviews Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer — Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (in press), 1977.
13. Levitzki A. The role of GTP in the activation of adenylate cyclase. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 74, 1154—1159.
14. Lymn R. W., Taylor E. W. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. — *Biochemistry*, 1971, 10, 4617—4624.
15. Maguire M. E., van Arsdale P. M., Gilman A. G. An agonist specific affect of guanine nucleotides on binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor. — *Mol. Pharmacol.*, 1976, 12, 335—339.
16. Orly J., Schramm M. Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylate cyclase from another cell by cell fusion. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 4410—4414.
17. Oye J., Sutherland E. W. The effect of epinephrine and other agents on adenyl cyclase in the cell membrane of avian erythrocytes. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 127, 347—354.

18. *Pfeuffer Th.* GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylylate cyclase activity. — *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 7224—7234.
19. *Pfeuffer Th., Helmreich E. J. M.* Activation of pigeon erythrocyte membrane adenylylate cyclase by guanylnucleotide analogs and separation of a nucleotide binding protein. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 867—876.
20. *Puchwein G., Pfeuffer Th., Helmreich E. J. M.* Uncoupling of catecholamine activation of pigeon erythrocyte membrane adenylylate cyclase by filipin. — *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 3232—3240.
21. *Salomon Y., Lin M. C., Londos C., Rendell M., Rodbell M.* The hepatic adenylylate cyclase system. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 4239—4245.
22. *Salomon Y., Rodbell M.* Evidence for specific binding sites for guanine nucleotides in adipocyte and hepatocyte plasma membrane. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 7245—7250.
23. *Schramm M., Rodbell M.* A persistent active state of the adenylylate cyclase system produced by the combined actions of isoproterenol and guanylyl imidodiphosphate in frog erythrocyte membrane. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 2232—2237.
24. *Spiegel M. A., Aurbach G. D.* Binding of 5'-guanylylimidodiphosphate to turkey erythrocyte membranes and effects on  $\beta$ -adrenergic-activated adenylylate cyclase. — *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 7630—7636.
25. *Steer M. L., Levitzki A.* The control of adenylylate cyclase by calcium in turkey erythrocyte ghosts. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 2080—2084.
26. *Steer M. L., Levitzki A.* The interaction of catecholamines:  $\text{Ca}^{2+}$  and adenylylate cyclase in the intact turkey erythrocyte. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, 167, 371—375.

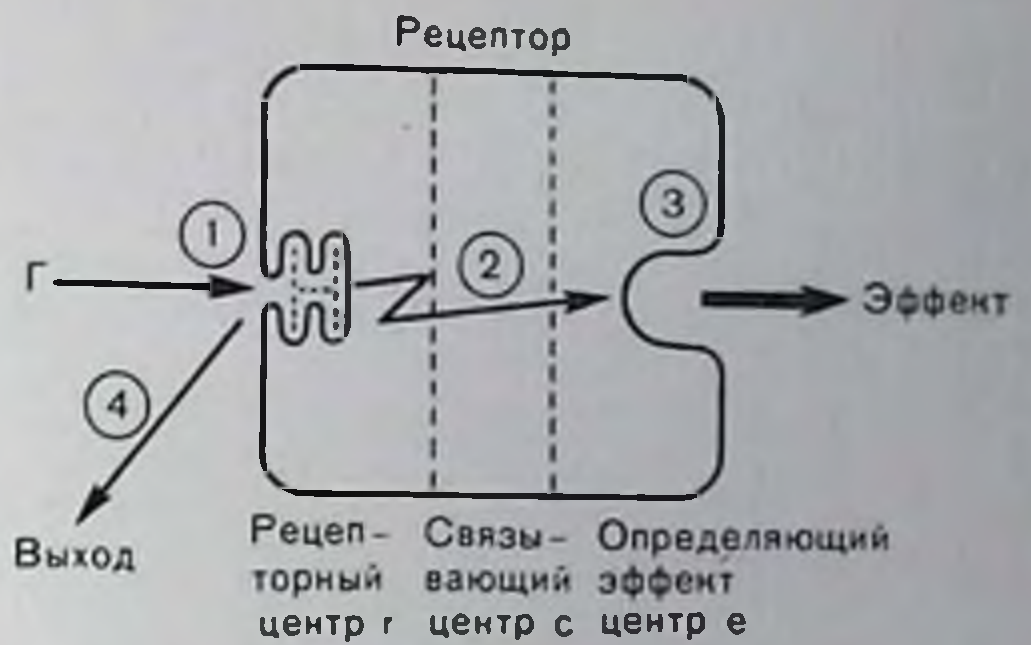
**РЕЦЕПТОРЫ ЭСТРОГЕНОВ И ВОСПРИИМЧИВОСТЬ  
К ДЕЙСТВИЮ ГОРМОНОВ: НОВЫЕ ПОДХОДЫ  
В ФАРМАКОЛОГИИ И ТЕРАПИИ**

ЭТЬЕН-ЭМИЛЬ БОЛЬЕН  
(ETIENNE-EMILE BAULIEN)

*Отдел исследований молекулярного метаболизма и физиопатологии  
стероидов, Национальный институт медицинских исследований,  
Отдел биологической химии, Факультет медицины Бисетры,  
94270 Бисетра, Франция*

Подобно другим стероидным гормонам, эстрогены представляют собой информационные молекулы. Эти химические мессенджеры должны находить на уровне своих клеток-мишеней некие специфические распознающие механизмы, которые позволят им различать именно эти клетки среди различных компонентов окружающей среды. Эти механизмы распознавания предусматривают наличие специфических центров связывания  $r$  (рис. 28), обладающих исключительно высоким сродством (измеренные в условиях равновесия константы имеют порядок  $10^{-10}$ — $10^{-11}$  М и соответствуют очень низким концентрациям эстрадиола в плазме) и столь же высокой специфичностью (стереоспецифичность). Узнавание эстрогенов представляет собой первую функцию их рецепторов [8]. Взаимодействие гормонов с их рецепторами не сказывается на химической структуре эстрогенов, «информационный» феномен является чисто «физическим».

Рис. 28. Феноменологическое описание рецептора стероидных гормонов. И представляет собой любой стероидный гормон. Он связывается (1) с высокоаффинным рецепторным центром г, вслед за чем происходит передача или сочетание связанного гормона (2), приводящая к активации центра е, определяющего эффект гормона (3). Последний центр может, например, взаимодействовать с другой макромолекулой или катализировать химическую реакцию, или участвовать в обоих этих процессах. Ядерный центр, с которым рецептор связывается в ядре, на рисунке не показан. Этот центр может быть идентичен центру е. Как только произошло инициирование процесса, гормон уже не нужен (4).



### РЕЦЕПТОРЫ И ИХ ДЕЙСТВИЕ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

Специфическое связывание, даже с высоким сродством, не является исчерпывающей характеристикой рецептора. Существуют другие белки, например связывающий половые стероиды белок плазмы (ПБП), который способен связывать половые стероидные гормоны и, в частности, эстрадиол с очень высоким сродством [30]. Однако этот транспортный белок, хотя его функции не очень хорошо изучены, не представляет собой рецептора. Кроме того, он не связывает очень активный синтетический нестероидный эстроген диэтилстильбэстрол (табл. 13), что указывает на отсутствие прямой зависимости типа причина — эффект между связыванием с белком плазмы и эстрогенной активностью соединения.

Смысл слова «рецептор» включает ответственность за интерпретацию полученного сигнала (в данном случае гормонального), приводящую к развитию клеточного ответа. Связывание гормона по соответствующему связывающему центру г приводит к активации исполнительного центра е рецептора (см. рис. 28), который в свою очередь взаимодействует с эффекторным компонентом клетки, на котором начинается цепь сложных реакций, известная под названием гормонального ответа. Таким образом, на молекулярном уровне в рецепторе должна существовать преобразующая система между центрами г и е, предусматривающая и аллостерический переход в молекуле рецепторного белка. На клеточном уровне рецептор будет представлять собой простейшее надмолекулярное образование, с которым должен взаимодействовать гормон, чтобы вызвать соответствующий ответ. Впоследствии этот ответ может прекратиться и действительно прекращается, что доказывается необходимостью новых порций гормона в клетках-мишенях; этот факт хорошо известен эндокринологам, поскольку секреция гормонов в организме является непрерывной [4].

Таблица 13. Белки, связывающие стероидные гормоны (+ + + + + K<sub>дисс</sub> 0,1 нМ, + + K<sub>дисс</sub> 10 нМ)

	Тестостерон/ андростанолон	Андростанднолы	Эстрадиол	Диэтилэтил- бэстрол	Прогестерон	Кортизол	Альдостерон
Плазма							
Белок плазмы, свя- зывающий по- ловые стероиды	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+	0	0	0
Транскортин	+		±		+ + + + +	+ + + + +	+
Ткани							
Рецептор:							
эстрогенов	±		+ + + + +	+ + + + +	0	0	0
андрогенов	+ + + + +		+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +
глюкокорти- костерондов		±	+ + + + +	±	0	0	0
прогестагенов	+		0	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +
минерало- кортикосте- роидов	0	0	0	0	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +

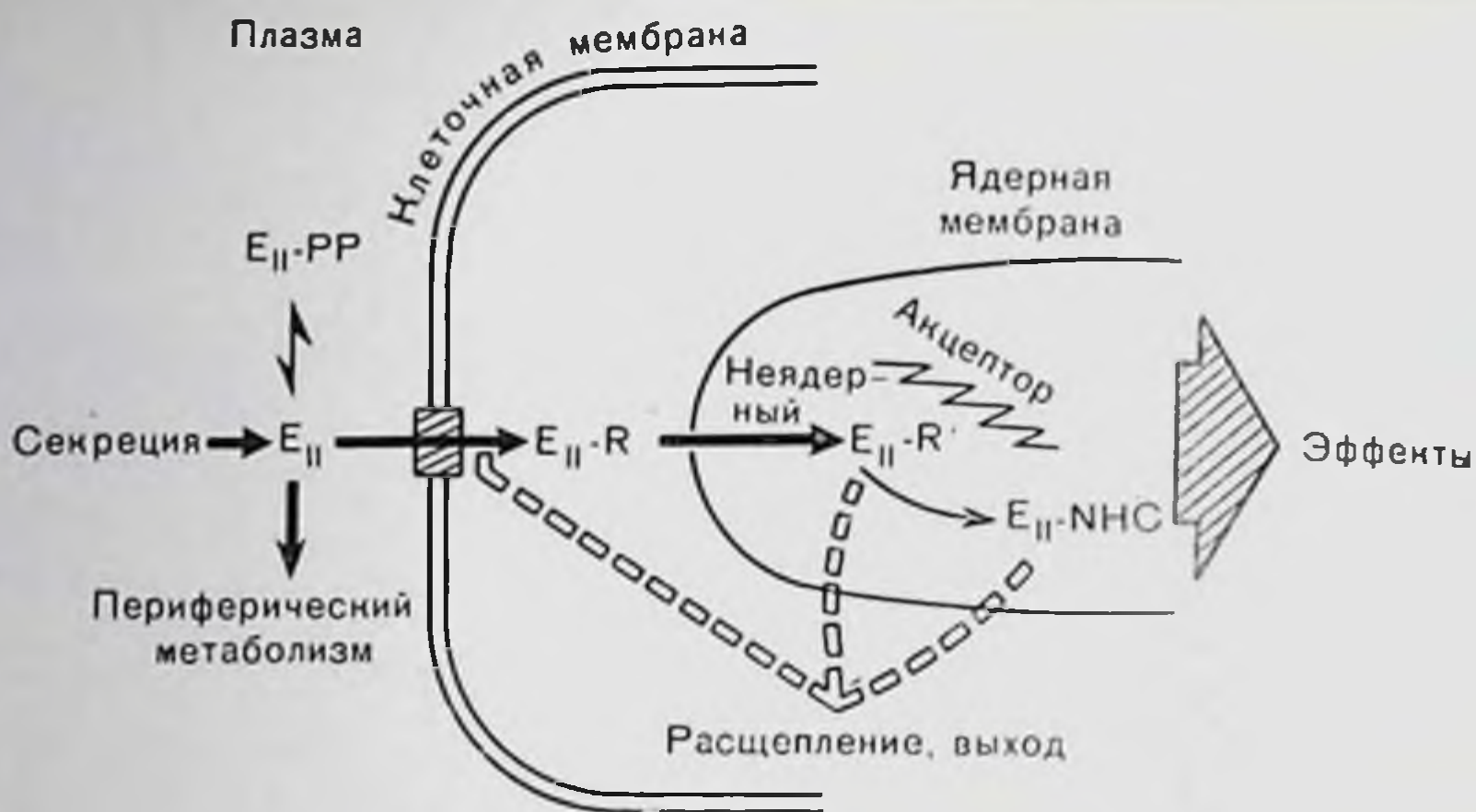
Примечание. Результаты дают суммарное сродство различных гормонов к белкам плазмы и рецепторов клеток-мишеней. Шкала значений соответствует указанным интервалам равновесных констант диссоциации.

Ранние эксперименты Jensen и Jacobson [20], Glascock и Hoekstra [17] продемонстрировали избирательное накопление и задерживание радиоактивно меченых эстрогенов в их органах-мишенях, например в матке и гипофизе. Позднее, в 60-х годах, в работах Jensen [21], Gorski [18, 55, 56], Segal [54] и нашей лабораторией [1, 5, 6] было установлено, что рецепторы эстрогенов имеют белковую природу и внутриклеточную локализацию, причем именно они стали первыми подробно охарактеризованными рецепторами гормонов. Подобные же результаты были получены и для других стероидных гормонов. Вход стероидов внутрь клеток-мишеней и наличие их рецепторов внутри клеток отличаются от обнаруженного для многих полипептидных гормонов специфического связывания с наружной поверхностью клеточных мембран [23]. Известно, что в слу-





Рис. 29. Искользованный метод заключается в действии радиоактивного гормона (андростаполона с высокой удельной радиоактивностью) на клетки онухолн молочной железы. После инкубации в течение нескольких месяцев можно наблюдать «гранулы», соответствующие молекулам гормона, связанным с рецептором в ядрах клеток-мишеней.



**Рис. 30.** Схематическое изображение превращений эстрадиола. Эстрадиол секретируется и циркулирует в плазме, будучи в основном связанным со специфическим белком (PP), белком плазмы, связывающим половые гормоны. Свободный эстрадиол ( $E_1$ ) проникает в клетку-мишень, вероятно, с помощью белковой транспортной системы, как это показано на схеме. Связывание с рецептором R ведет к структурному переходу R в R' и перемещению комплекса ближе к ядру, где он связывается с еще не идентифицированным акцептором. Указывалось на возможное присутствие негистонного хроматина (NHC), который связывает эстрадиол с высоким средством [7]. В любой момент нахождения в клетке эстрадиол может быть разрушен химически или вновь выделен из клетки; оба эти процесса могут происходить одновременно. Место назначения рецептора после его связывания с акцепторным центром пока с определенностью неизвестно, поскольку с помощью радиоактивных гормонов мы можем оценить только его доступность для мест связывания. Следовательно, необходимо идентифицировать рецепторный белок и сам по себе, например с помощью антител.

чае этих мембран «исполнительное» действие рецепторов заключается преимущественно, а иногда исключительно в активации мембраносвязанного фермента аденилатциклазы, что вызывает повышение концентрации цАМФ, представляющего собой, по Sutherland, второй мессенджер для вызова клеточного ответа. цАМФ не играет роли в развитии клеточного ответа на действие стероидных гормонов. После попадания внутрь клетки способом, который до сих пор является предметом дискуссий [36, 42], гормон связывается с рецептором, обнаруженным в цитоплазме, и вызывает изменение его свойств [21, 18]. Этот процесс, называемый «ацидофильной активацией» [35], приводит к тому, что образовавшийся комплекс гормон — рецептор становится способным взаимодействовать с рядом полианионов, в частности с ДНК. Этот эффект, вероятно, связан с вторичной локализацией комплекса гормон — рецептор в ядрах клеток-мишеней, где он кооперируется с соответствующими акцепторными структурами [14, 18, 21] (рис. 29) и носит поэтому название неядерного рецептора [47] (рис. 30). Важно понять, что с функциональной точки зрения акцептор представляет собой внутриядерную структуру, способную связываться с рецептором, активированным эс-

традиолом. Пока неизвестно, являются ли акцепторный и «исполнительный» центры рецептора одним и тем же или являются ли структуры внутриядерного акцептора и эффектора идентичными. Эти проблемы являются наиболее фундаментальными и наиболее сложная из них — механизм действия гормонов на уровне генетической транскрипции. Изучение хроматина в чувствительных к действию гормонов клетках, вероятно, поможет найти ответ на этот вопрос. Однако исследования, проведенные в нашей и некоторых других лабораториях [25, 26], продемонстрировали гетерогенный характер популяции ядерных рецепторов эстрадиола, одна фракция которых легко экстрагируется буферным раствором, содержащим соли (например, 0,3 М КСl), а другая действию этого раствора не поддается. Точное значение этих фракций неизвестно, но можно предположить, что наиболее прямое действие на эффектор будет оказывать та из них, которая сильнее внедрена в структуру хроматина.

В ядрах, хотя механизмы происходящих явлений на молекулярном уровне не известны, быстро возникают серьезные изменения генетической транскрипции. В частности, обнаружен эффект быстрого увеличения активности РНК-полимеразы А (связанной с прерибосомальным синтезом РНК), определяемый увеличением числа молекул этого фермента в транскрипционных комплексах. Такое увеличение активности не отмечено для РНК-полимеразы В (вовлеченной в синтез мессенджерной РНК), однако изменение активности фермента под действием специфического молекулярного механизма или изменений в хроматине обнаруживается достаточно быстро [13]. Положение еще больше осложняется кажущейся зависимостью синтеза быстро обменивающегося белка от увеличения активности полимеразы А [44] и незнанием механизма и значения быстрого увеличения клеточного включения воды, электролитов и молекул питательных веществ после действия гормона. В любом случае, каковы бы ни были клетки-мишени, эстрогенный ответ характеризуется повышенным синтезом РНК и увеличением количества белков, среди которых можно выделить две отчетливые категории. С одной стороны, это относится к специфическим белкам типа яичного альбумина и других яичных белков в яйцеводах птиц Lh — Rh-рецепторов в гипофизарных гонадотропиновых клетках, транскуртина, ПБП и трансферрина в клетках печени или рецепторов прогестерона в клетках матки. Позднее было показано, что в различных клетках, подвергнутых действию эстрадиола, увеличивается количество и самого рецептора эстрогенов, что повышает восприимчивость клеток к гормону. С другой стороны, во многих случаях наблюдается повышение содержания ряда неспецифических белков, участвующих в клеточном росте, как, например, белков, обеспечивающих синтез ДНК и деление клеток, которое начинается примерно через 20 ч после начала стимуляции неактивных клеток. В некоторых случаях действие гормона приводит к качественным изменениям в синтезе ДНК: в процессе дифференциации дочерие

клетки отличаются от исходных. Последний случай отчетливо наблюдается на примере яйцеводов птиц, особенно цыплят, у которых примитивные и относительно одинаковые эпителиальные клетки трансформируются в ресничные трубчатые и губчатые клетки, синтезирующие перечисленные ранее белки, входящие в состав яичных белков.

Множественность ответов на действие эстрадиола в различных биологических системах ставит фундаментальный вопрос: является ли рецептор, позволяющий клеткам реагировать по любому из перечисленных механизмов, одинаковым, даже если учесть, что основной тип реакции зависит от вида клеток, на развитие которого гормон влияния не оказывает? Согласно принятым в настоящее время концепциям такая возможность не исключается, что подтверждается подобием их физико-химических свойств и связыванием гормонов рецепторами различных органов даже на разных этапах их развития. Специфичность и аффинность взаимодействия рецепторов с гормонами также близки во всех случаях.

Представляется вероятным, что внутриклеточные стероидсвязывающие белки являются «истинными» рецепторами, хотя это еще формально и не продемонстрировано, поскольку эффектор, которому соответствует «исполнительный» центр рецептора, не был обнаружен и поэтому не может быть описан с применением молекулярных терминов (см. рис. 28). Это предположение, однако, подкрепляется тремя сильными, хотя и косвенными аргументами и четвертым, более прямым подтверждением.

1. Параллелизм между сродством различных эстрогенов, стероидов или даже нестероидных производных по отношению к рецептору и их биологических активностей заставляет думать именно так (слабые эстрогены обладают малым сродством). Эта корреляция отсутствует в случае транспортных белков плазмы. Более того, антигормоны могут обладать высоким сродством к рецептору, практически равным таковому для некоторых гормональных агонистов.

2. Само по себе присутствие стероидных рецепторов в клетках-мишенях наводит на размышление, особенно, если учесть, что они не обнаруживаются в клетках-не мишенях и генетически нечувствительных тканях (например, в органах-мишенях для андрогенов при синдроме феминизации тестикул или в вариантах культур клеток лимфомы). Более того, многочисленные наблюдения *in vivo* и *in vitro* указывают на заметный параллелизм между концентрацией гормональных рецепторов и интенсивностью клеточного ответа. В случаях, когда патологические клетки из органов, которые физиологически подвержены действию эстрогенов, не содержат рецепторов, они не реагируют на действие этих гормонов [27, 28].

3. Активация рецепторов, описанная выше, является строго гормонально-зависимой в экспериментах *in vitro* (изменение сродства рецептора по отношению к полианионам), так же как и в клетках. Она может регулировать транслокацию рецепторов в яд-

ра; этот эффект, вероятно, связан с важной стороной активности стероидов на уровне транскрипции.

4. В ряде экспериментов, впервые выполненных в нашей лаборатории [40, 43], ядра клеток (ген-транскрибирующие компоненты) нестимулированной ткани были подвергнуты действию препаратов, содержащих комплекс гормон — рецептор. Важным результатом являлась демонстрация увеличения синтеза РНК, зависящего от гормона и от цитозоля. Какие бы ограничения этого результата ни существовали с молекулярно-биологической точки зрения [4, 7], он является прямым доказательством необходимой роли рецепторов в механизме действия гормонов.

Все приведенные соображения являются фундаментом для подтверждения тезиса, что специфические белки, селективно связывающие соответствующие гормоны в данной ткани, представляют собой рецепторы, способные узнавать гормоны и действующие в качестве мессенджеров. Это указывает, что количественное и качественное определение их параметров будет иметь важное практическое значение для лучшего понимания гормональной чувствительности и позволит реализовать фармакологический контроль за функцией как отдельных клеток, так и организма в целом.

С технической точки зрения вся работа с рецепторами базируется на ряде теоретических и технических предосторожностей:

1. Необходима точная технология, способная разграничивать специфическое и неспецифическое связывание, поскольку альбумин и многие другие белки связывают все стероиды неспецифически с относительно высоким сродством, соответствующим равновесной константе связывания  $10^{-5}$  М.

2. Нужно проводить определение сродства и числа центров связывания независимо от того, заняты ли они эндогенными гормонами, принимая во внимание концентрацию белка или ДНК в изучаемых экстрактах тканей.

3. Необходимо определять число доступных мест связывания, т. е. тех центров, которые не заняты гормонами в момент эксперимента и поэтому могут быть помечены прямым связыванием добавленных радиоактивных стероидов к соответствующему экстракту, а также, что еще лучше, общее число связывающих центров, принимая во внимание, что эндогенный гормон занимает часть из них. Наиболее часто используемый и наиболее простой метод такого определения выполняется при  $0-4^{\circ}$  С, что позволяет избежать ряда артефактов и потери белка за счет денатурации или протеолиза. Таким образом, может быть установлено число свободных (незанятых) центров. Однако для определения общей концентрации цитоплазматических связывающих или ядерных центров (которые обязательно должны быть заняты, поскольку рецептор приобретает способность проникать в ядро только после гормональной стимуляции) необходимо использовать специальные приемы, позволяющие заменить эндогенный гормон на меченый радиоактивный эстрадиол. В этом случае методический подход

предусматривает повышение температуры в эксперименте, что позволяет ускорить процесс диссоциации эндогенного гормона и, следовательно, обмен его на радиоактивный эстрадиол. Все это указывает на необходимость тщательной стандартизации используемых методов [2, 32, 37, 51].

4. Нужно изучать параметры связывания, используя различные производные гормонов и определяя их молекулярные свойства, например чувствительность к агентам, блокирующим сульфгидрильные группы. Это важно не только для установления белковой природы связывающих центров, но и для разделения эффектов рецепторов и различных плазмальных белков, которые могут загрязнять изучаемый экстракт [38].

5. Необходимо раздельное изучение рецепторов, присутствующих в цитозоле, т. е. во фракции, предположительно соответствующей цитоплазме, и рецепторов, принадлежащих ядерной фракции, т. е. экстрагируемых КС1 и нерастворимых [26].

Очевидно, что эксперимент, базирующийся на высказанных положениях, должен быть достаточно сложным, проводится с величайшим вниманием и без использования различных упрощений, которые могут привести к неверным выводам.

#### ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГОРМОНАЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ-МИШЕНЯХ

Когда гормон получает доступ в клетку, лишенную эстрогена и обладающую цитоплазматическим рецептором, значительная часть этого рецептора проникает в ядра, причем максимум проникновения достигается в течение 30—60 мин. Параллельно этому наблюдается уменьшение концентрации рецептора в цитоплазме. После некоторого времени процесс начинает идти в обратном направлении, т. е. содержание рецептора уменьшается в ядрах и увеличивается в цитоплазме. При исследовании яйцевода (рис. 31) после инъекции эстрадиола молодым цыплятам в количестве 100 мкг на 1 кг массы общая клеточная концентрация рецептора остается постоянной в течение 6 ч [52]. Более того, ответ на введение эстрадиола представляет собой результат изменения распределения рецептора. Действительно, по истечении 6 ч наблюдается повышение общего содержания рецептора за счет увеличения количества цитоплазматического рецептора, поскольку уже нет свободно циркулирующего эстрадиола, который необходимо транспортировать в ядра. Таким образом, увеличение содержания собственного рецептора является ранней реакцией на эстрадиол.

Ситуация усложняется при введении цыплятам большего количества эстрадиола — 1 мг/кг (рис. 32,А). В этом случае в течение первого часа содержание рецептора в ядрах достигает того же уровня, что и при введении меньшей дозы гормона; параллельно снижается количество рецептора в цитоплазме. Однако вместо возвращения к исходному уровню через 6 ч количество

ядерного рецептора продолжает повышаться в течение 12 ч, тогда как содержание цитоплазматического рецептора остается пониженным. Эти результаты свидетельствуют о продолжающейся циркуляции гормона после введения большой его дозы. В результате этой циркуляции увеличивается синтез рецепторов в цитоплазме, которые, будучи немедленно активированы свободным эстрадиолом, проникают в ядра, где и накапливаются. После некоторого времени концентрация свободного эстрадиола снижается и число связывающих центров в цитоплазме приходит в норму, даже с некоторым превышением над исходным значением, которое наблюдается через 24 ч (этот эффект выражен сильнее, чем при введении малой дозы гормона).

Таким образом, эффекты двух разных доз гормона не связаны, по-видимому, с различием в начальном повышении количества ядерного рецептора, достигающем максимума через 1 ч после введения 100 мг эстрадиола на 1 кг массы (рис. 32, Б). Более выраженный ответ на введение большей дозы связан с более длительной циркуляцией в клетке свободного эстрадиола, в результате чего он оказывает продолжительное воздействие на рецепторную систему, усиливая синтез рецептора и вызывая повышенное накопление его в ядрах. Так, например, специфическое влияние эстрадиола на синтез рецептора прогестерона (рис. 33) свидетельствует о наличии одинаковых скоростей аккумуляции этого рецептора в ядрах после действия разных доз гормона в течение первых часов; по-видимому, вследствие определенной начальной концентрации рецептора в ядрах, но после определенного времени реакция на большую дозу гормона все равно становится более выраженной. Реакция прогестероновых рецепторов на эстрадиол является, по-видимому, основой для развития первичных ответов на эстрадиол в матке [34], яйцевом [41] и ткани молочной железы [29]. В данном случае мы имеем дело с синтезом, а не с «ак-

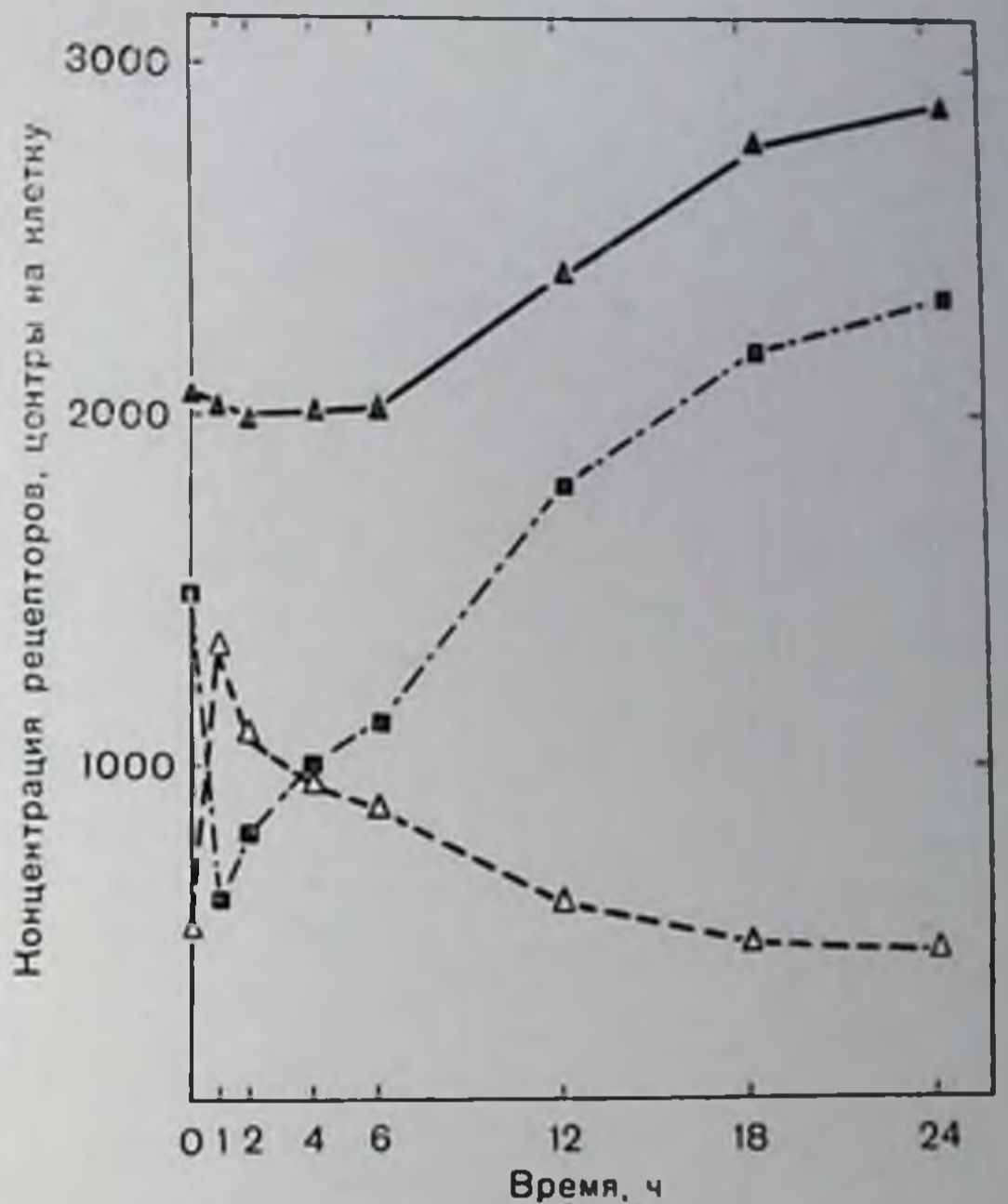


Рис. 31. Циторастворимые (черные квадраты), ядерные (белые треугольники) и суммарные (черные треугольники) рецепторы в яйцевом цыпленка после введения в момент времени 0 эстрадиола в дозе 100 мкг/кг.

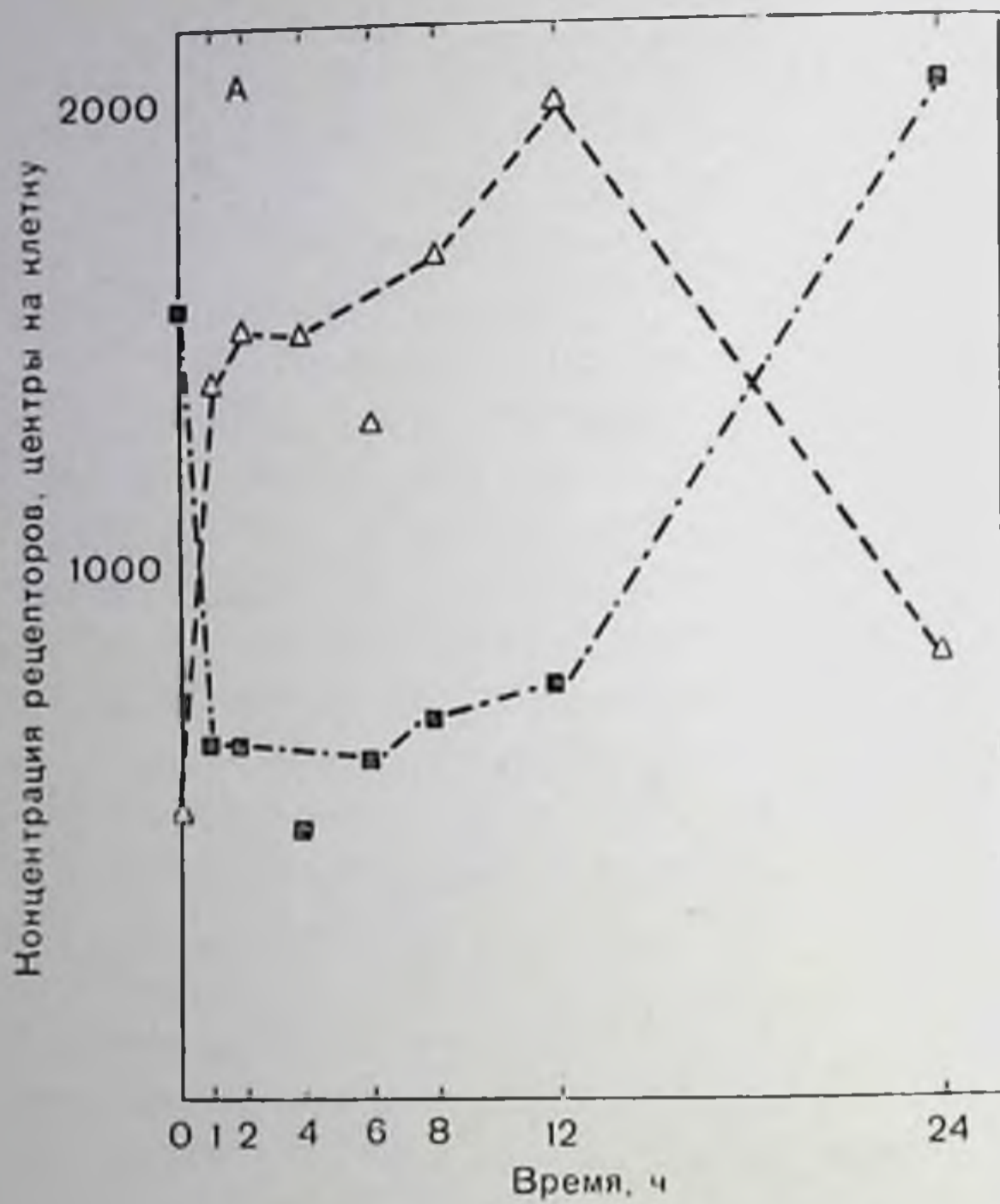
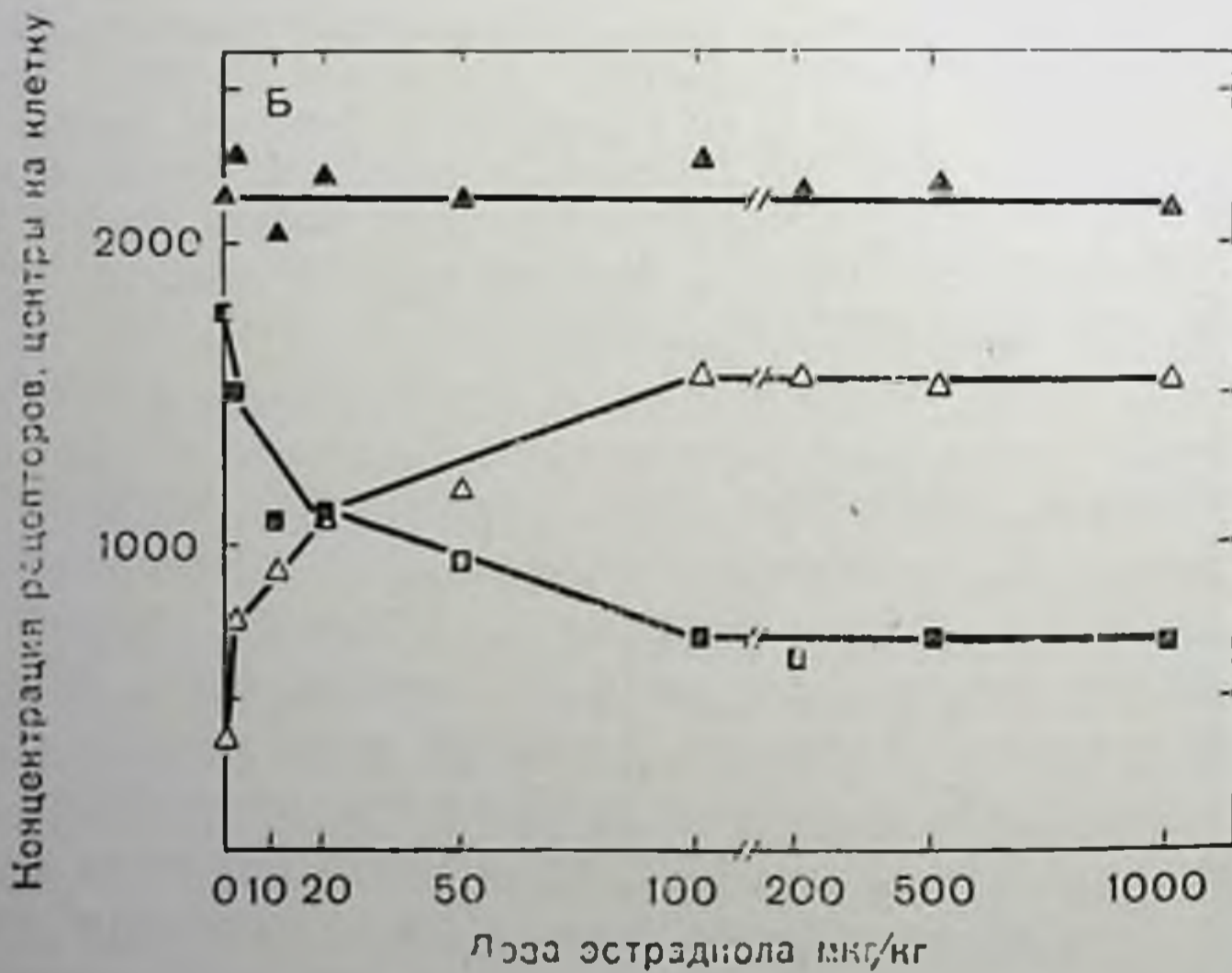


Рис. 32, А. Циторастворимые (черные квадраты) и ядерные (белые треугольники) рецепторы в яйцеводе цыплят после введения в момент времени 0 эстрадиолбензоата в дозе 1 мг/кг.

Рис. 32, Б. Рецепторы эстрадиола в цитозоле (черные квадраты), ядрах (светлые треугольнички) и суммарные (черные треугольнички) в яйцеводах цыплят через 1 ч после введения указанных доз эстрадиола.



тивацией», как показано на примере матки морских свинок, когда ответ на введение эстрадиола был подавлен введенным циклогексимида и актиномицина [39].

Приведенные результаты очевидны, но не исчерпывают всей сложности ситуации. И действительно, кажется, что рецепторы некоторых стероидных гормонов претерпевают инактивацию даже при действии их собственного гормона, как будто в определенных случаях происходит «расходование» рецептора. Это может быть характерно для эстрадиола, но ситуация, возникающая в резуль-



Рис. 33. Цитозольные рецепторы прогестерона в яйцевом цыплят после введения в момент времени 0 эстрадиолбензоата в дозе 100 мкг/кг (черные кружки) и 1 мкг/кг (светлые треугольники).

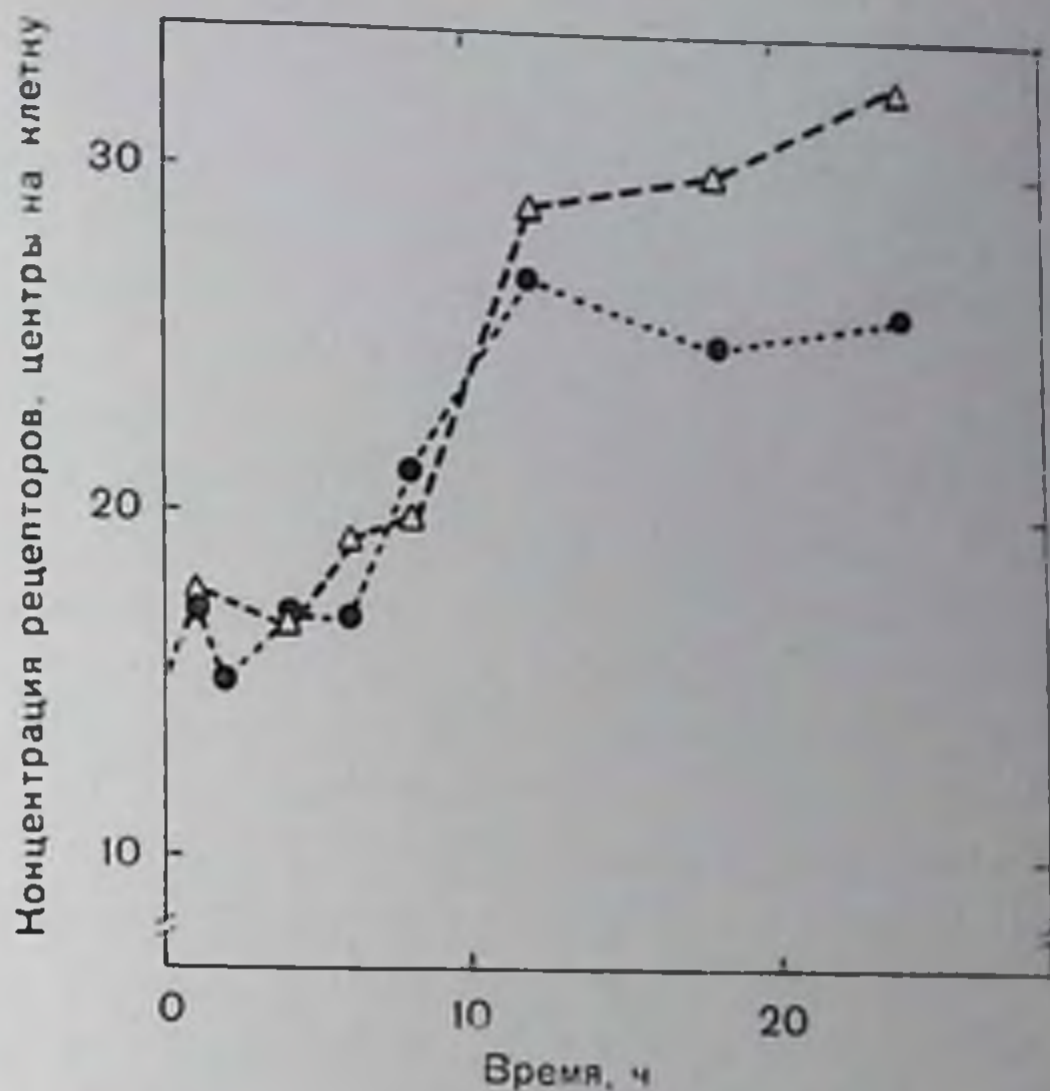
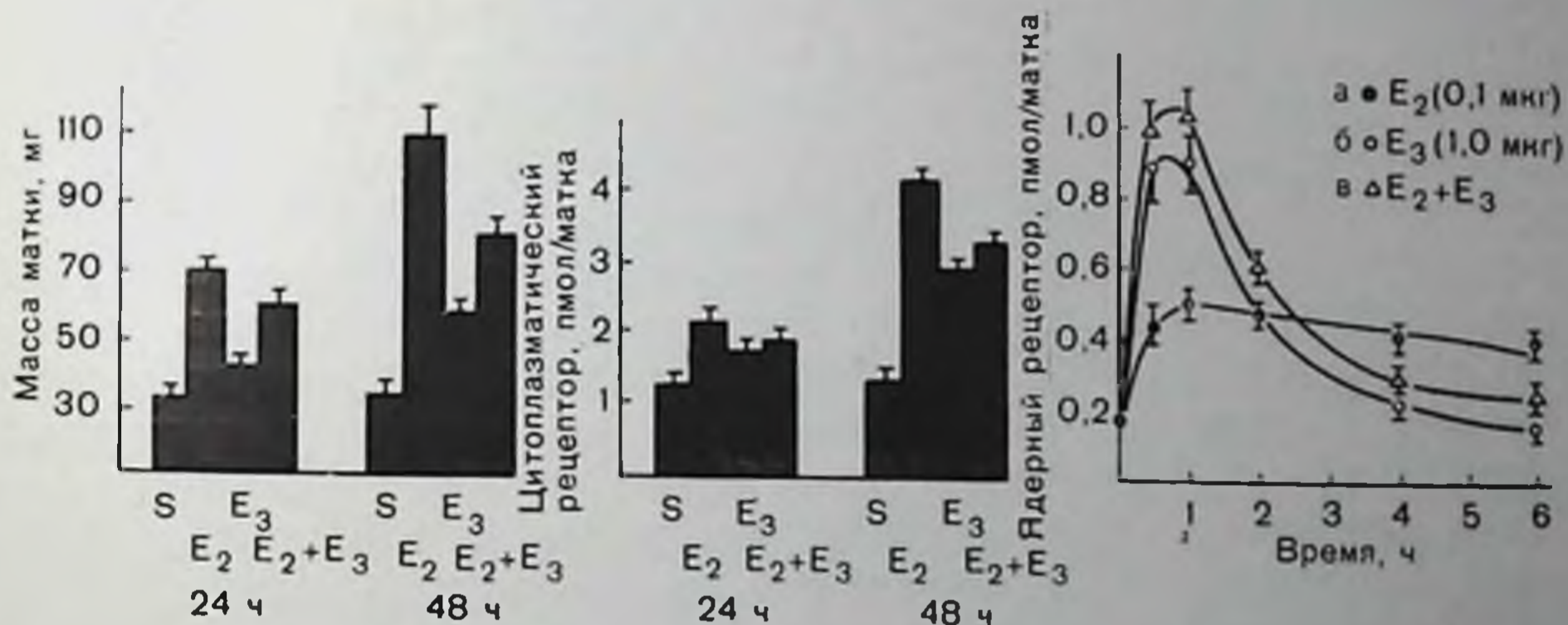


Рис. 34. Сравнение эффектов, вызываемых отдельным и одновременным введением крысам эстрадиола и эстриола в дозах 0,1 и 1 мкг соответственно. Диаграммы показывают массу маток и содержание цитозольных рецепторов через 24 и 48 ч после введения. Кривые описывают изменение концентрации ядерных рецепторов эстрогена в течение 6 ч после введения [12].



тате действия гормона на синтез его собственного рецептора, плохо поддается анализу [31]. Наряду с этим другие эстрогены могут взаимодействовать с рецепторами отличным от эстрадиола способом, даже если они также переносят свой рецептор в ядра. Диэтилстильбэстрол, сильный нестероидный гормон, вызывает аналогичные временные изменения в концентрации рецепторов. Изучение действия эстрогена осложняется тем, что он может превращаться в эстрадиол внутри клеток-мишеней. Изучение действия эстриола и диметилстильбэстрола продолжается. Соответствующие дозы этих гормонов вызывают повышение содержания ядерных рецепторов, подобно эстрадиолу, через 30—60 мин после введения. Однако последующее понижение концентрации рецепторов для этих гормонов происходит гораздо быстрее, чем для эстрадиола и диэтилстильбэстрола [12], непродолжительное время нахождения соответствующих рецепторов в ядрах связано, по-видимому, со слабым или неполным влиянием единичных доз этих слабых гормонов на различные параметры эстрогенного ответа по сравнению с действием сильных гормонов (рис. 34). Однако при

использовании непрерывного или многократного введения эстриола удается одновременно наблюдать нахождение рецептора в ядрах и эстрогенный эффект, аналогичный таковому для эстрадиола, что дополнительно подтверждает кратковременность действия названных слабых гормонов, чья аффинность меньше, чем аффинность эстрадиола по отношению к рецептору эстрогенов. Таким образом, можно полагать, что рецептор эстрадиола является основным по своим связывающим свойствам и по внутриклеточной реакционной способности, позволяющим объяснить действие эстрогенов. Это обобщение можно даже распространить и на андрогены, в частности андростанолон (дигидротестостерон), который благодаря некоторой аффинности к рецептору эстрогенов обладает эстрогенной активностью в отношении синтеза белка на уровне матки [48, 16].

Совершенно иные проблемы возникают при действии гормонов типа прогестерона, который не обладает никаким сродством по отношению к рецептору эстрадиола и чья биологическая активность физиологически глубже вовлечена в действие эстрогенов. Выше мы описали действие эстрадиола на рецепторы прогестерона. Теперь мы обсудим влияние прогестерона на маточные рецепторы эстрадиола на примере выполненных на крысах экспериментов. В течение первых дней беременности рецепторы гормонов претерпевают серьезные изменения [33] (рис. 35). Раздельное измерение концентрации цитозольных рецепторов в экстрактах из слизистой оболочки и мышечной стенки матки показало, что в расчете на звено ДНК количество связывающих центров всегда больше в слизистой оболочке, причем это различие становится заметным после 3-го дня и достигает максимума на 5—6-й день, тогда как изменения концентрации рецепторов в мышечной ткани незначительны. На основании того факта, что концентрации эстрадиола и прогестерона в крови увеличиваются в ранних стадиях беременности, был проведен эксперимент, в котором гормоны вводили кастрированным крысам по истечении 3 нед прекращения действия эндогенных гормонов (рис. 36). Наблюдаемое повышение концентрации рецепторов эстрадиола в слизистой оболочке и в мышце не явилось неожиданным. Примечательно, однако, что прогестерон оказывает такое влияние на концентрацию рецептора эстрогена в слизистой оболочке, тогда как при введении совместно с эстрадиолом он понижает индуцированное эстрогеном повышение концентрации рецептора в мышечной оболочке. Наблюдавшиеся в эксперименте изменения концентрации рецептора эстрадиола после введения эстрогена и прогестерона подобны происходящим в ранние сроки нормально протекающей беременности. Этот факт подчеркивает точность описанных экспериментов, выполненных на легкоконтролируемых моделях. Антагонистическое действие прогестерона на индукцию рецепторов эстрадиола в мышечной оболочке матки может облегчать имплантацию благодаря понижению эстрогензависимой чувствительности по отношению к катехоламинам и простагландину  $F_{2\alpha}$  [3].

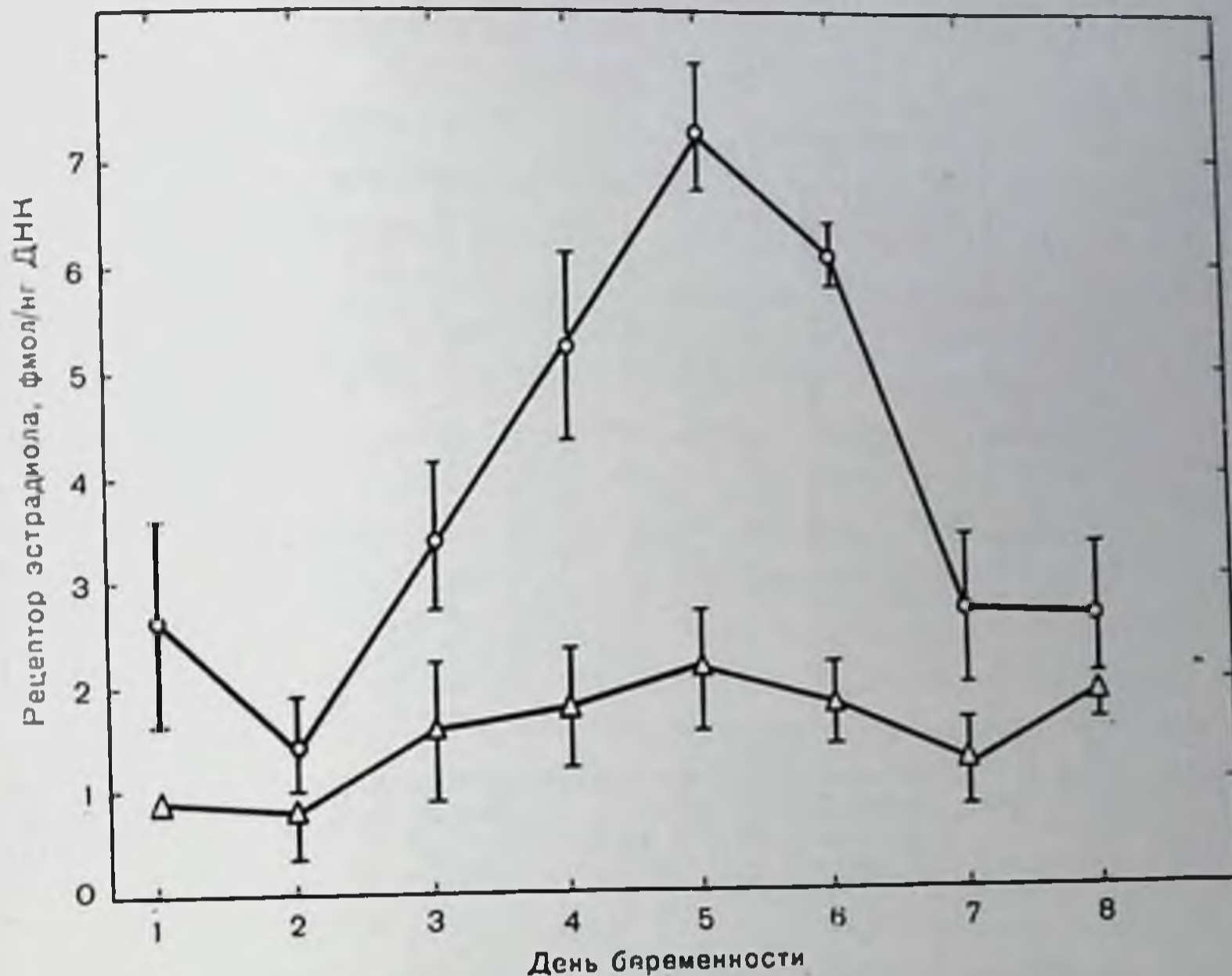
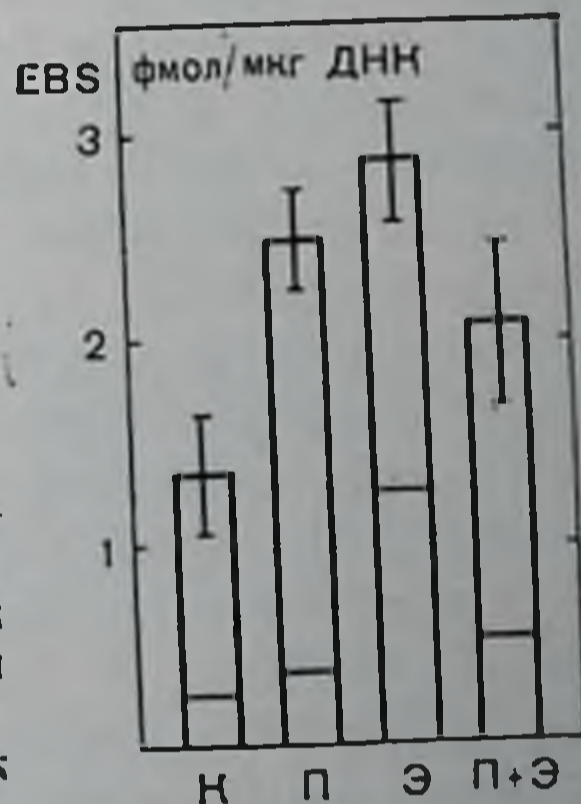


Рис. 35. Рецепторы эстрадиола в матке крыс на ранней стадии беременности. Изменение количества рецепторов в слизистой оболочке матки (верхняя линия) и в мышечной оболочке матки (нижняя линия).

Рис. 36. Полученные данные показывают, что результаты, приведенные на рис. 35, могут быть воспроизведены на кастрированных животных при одновременном введении им прогестерона (П) и эстрадиола (Э). Результаты приведены в сравнении с контролем (К) для слизистой (светлые столбик) и мышечной (заштрихованные столбик) оболочек матки [33].



Недавно полученные при изучении яйцевода цыплят результаты еще раз указали на сложность взаимодействий между прогестероном и рецептором гормонов. В частности, представляется, что прогестерон дает быстрый антиэстрогенный эффект, проявляемый, по-видимому, через нетранскрипционный механизм. Однако для ряда биологических реакций наблюдается последующее возвращение концентрации рецепторов эстрадиола к норме, иногда даже с некоторым превышением начального уровня [52]. Действие прогестерона на рецептор эстрадиола пока еще полностью не выяснено, но эффект разных доз [50] и различное развитие при этом ответных реакций во времени должны приниматься во внимание при изучении периодичности течки или менструального цикла для того, чтобы лучше понять физиологию и патофизиологию органов-мишеней для женских половых гормонов.

Таблица 14. Рецепторы эстрадиола и прогестерона в течение нормального менструального цикла

Дни цикла	Рецепторы эстрадиола			Рецепторы прогестерона		
	суммарный	цитозольный	ядерный	суммарный	цитозольный	ядерный
-10 —5	6176	4536 (73)	1640 (27)	6084	4896 (80)	1188 (20)
-4 0	7732	4120 (53)	3612 (47)	12052	9011 (75)	3041 (25)
+1 +6	4852	1622 (33)	3230 (67)	7580	3470 (46)	4110 (54)
+7 +12	2592	1062 (41)	1530 (59)	3541	2639 (74)	902 (26)

Примечание. День овуляции принят в качестве нулевого. Результаты выражены в количестве рецепторных центров (занятых или незанятых эндогенным гормоном) в цитозоле, ядрах и в сумме (цитозоль + ядра). Цифры в скобках — количество рецепторов, выраженное в процентах, в цитозоле и в ядрах от общего количества рецепторов.

Вместе с Boyard и Robel [9] мы определяли концентрацию рецепторов прогестерона в слизистой оболочке матки здоровых женщин в различные периоды цикла. Нами разработана оригинальная методика, позволившая определять концентрации рецепторов двух гормонов в одном и том же биопсийном образце как в цитоплазматическом, так и в ядерном компартментах. Предварительные результаты, полученные при исследовании 54 здоровых женщин, приведены в табл. 14. Примечательно, что они подтверждают принципы физиологической фармакологии, установленные нами на экспериментальных животных. Так, например, на протяжении фолликулярной стадии отмечается повышение концентрации рецептора эстрадиола с особо заметным увеличением в ядрах благодаря преовуляционному повышению концентрации эстрадиола. За этот же счет может быть отнесено и увеличение концентрации рецептора прогестерона в цитоплазме. Когда происходит секреция самого прогестерона, она приводит к понижению концентрации его рецептора с одновременным, как и можно было ожидать, увеличением времени нахождения этого рецептора в ядре вследствие соответствующей секреции яичников. Вслед за понижением концентрации циркулирующего прогестерона ситуация изменяется в обратном направлении. Концентрация рецептора эстрадиола понижается также на протяжении лютеальной фазы в соответствии с данными экспериментов, свидетельствующих об антагонистическом действии прогестагенов на рецептор эстрадиола [33, 57]. Возможно, что само по себе понижение концентрации рецептора эстрадиола является регуляторным актом, частично ответственным за уменьшение концентрации рецептора прогестерона после овуляции.

Таким образом, физиологические гормонзависимые изменения концентрации гормонов могут оказаться полезными для объясне-

ния некоторых регуляторных явлений. Эти же принципы могут быть приложены и к проблемам патологической физиологии. Рецепторы эстрадиола являются показателем восприимчивости к эстрогенам, и результаты, полученные при изучении рака молочной железы [28] и в ряде случаев при патологии слизистой оболочки матки (неопубликованные данные нашей лаборатории), являются в этом плане весьма обнадеживающими. Для того чтобы быть действительно значимыми, эти результаты должны быть получены с использованием методических принципов, изложенных выше, и с учетом физиологических регуляторных механизмов, изменяющих внутриклеточное распределение рецепторов и их концентрацию. При несоблюдении методологических предосторожностей значимость таких результатов может быть разочарующе ограниченной, хотя и есть немало оснований полагать, что исследования в этой области касаются фундаментальных механизмов действия эстрогенов. Кроме того, хотя определение числа рецепторов из экспериментов по связыванию и не вызывает сомнений, этот подход представляется не вполне удовлетворительным в двух отношениях. Во-первых, при измерениях параметров связывания удастся выяснить лишь часть свойств рецепторов, а их клеточная активность при этом остается невыясненной (взаимодействия с эффекторами). В будущем к используемым методам изучения связывания должны быть добавлены и функциональные тесты в системе *in vitro*. Кроме того, с другой стороны, рецептор может присутствовать в неактивной форме, что делает необходимым введение прямого метода определения концентрации рецептора, например при помощи иммунных методов с использованием антирецепторных антител. Во-вторых, помимо достаточно сложной проблемы изучения свойств рецептора, очевидно, что действие эстрогенов зависит и от других клеточных механизмов и что стадия, предшествующая рецепторному взаимодействию или последующая, может быть основой патологического ответа клеток. Суммированные здесь принципы не ограничиваются рецепторами гормонов. Близкое подобие наблюдается и при изучении других стероидных гормонов, включая витамин D, полипептидных гормонов, преимущественно инсулина, гонадотропных гормонов, гипоталамических факторов, нейромедиаторов, включая эндогенные аналоги морфина, и простагландинов. С практической точки зрения мы пытаемся понять, позволяют ли измерения содержания рецепторов адекватно оценить восприимчивость к гормональной регуляции, что необходимо для диагностики и терапии.

## ПРИРОДА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ

### Различные рецепторы для одного гормона в разных клетках-мишенях

Полагают, что рецепторы эстрадиола в различных тканях-мишенях идентичны и, даже если ответы в случае слизистой оболочки матки и шейки матки различаются, то все-таки рецептор

или по крайней мере его связывающие свойства одни и те же. Предполагается, что это положение справедливо для нормальных и патологических молочных желез, гипофаламуса, гипофиза и т. д.

### Различные рецепторы для разных гормонов в одних и тех же клетках

Сам факт, что эстрадиол способен индуцировать образование рецептора прогестерона, как было показано выше, позволяет предположить, что клетки матки, синтезирующие этот прогестероновый рецептор, содержат также и рецептор эстрадиола. Более формальное доказательство совместного существования двух типов рецепторов в одной клетке получено при изучении клонированных клеток (M1<sub>1</sub>) опухоли молочной железы мыши (SH1-115) (см. рис. 29), рост которых является андрогензависимым, антагонистами для которых служат эстрогены. В этих клетках имеется два различных типа рецепторов — рецептор эстрогена (E) и рецептор андрогена (A), которые связывают соответственно эстрадиол и тестостерон с исключительно высоким сродством [22]. Рецептор E не связывает тестостерон, тогда как рецептор A способен связывать эстрадиол с довольно высоким сродством, хотя и с более низким, чем рецептор E. Таким образом, что касается антиандрогенного действия эстрадиола, вопрос состоит в том, реализуется ли этот эффект через конкурентное действие на рецептор A, который в результате уже не может активироваться тестостероном, или связан с рецептором E, передающим антагонистическое действие на определенный участок генома или прямо конкурирующим с рецептором A за рецепторный центр.

### Различные рецепторы для одного гормона в одних и тех же клетках

В данном случае приведенные выше наблюдения, что эстрадиол способен связываться с обоими рецепторами E и A, являются одновременно доказательством того, что два различных рецептора могут связывать один и тот же стероид: относительное сродство таково, что рецептор E будет занят первым еще при низких концентрациях эстрадиола, тогда как рецептор A будет занимать постепенно по мере роста концентрации эстрадиола. Если эффекты, вызываемые комплексами рецептор E — эстрадиол и рецептор A — эстрадиол, являются противоположными, можно ожидать, что кривая доза — ответ будет иметь вид, отвечающий первоначальному росту ответа с повышением концентрации эстрадиола вплоть до значения, при котором начинается вторичная активация рецептора A. Это должно вызывать понижение интенсивности ответа; именно такая зависимость нередко и наблюдается в фармакологии.

Было также отмечено, что диэтилстильбэстрол, представляющий собой нестероидный эстроген, связывается с рецептором E практически идентично эстрадиолу, тогда как его взаимодействие с рецептором A незначительно. Известно, что диэтилстильбэстрол является «настоящим» эстрогеном, если его активность оценивается по действию на матку, и он широко используется в противораковой терапии [19].

Приведенные наблюдения указывают на принципиальную возможность разграничить действие диэтилстильбэстрола и эстрадиола на определенные рецепторы. Например, если наличие связывания эстрадиола с обоими рецепторами E и A является объяснением формы кривой доза — ответ, связывание диэтилстильбэстрола только с рецептором E позволяет предсказать, что в этом случае названная кривая не будет иметь нисходящего участка, а будет выходить на плато при достижении определенной концентрации гормона.

### Терапевтическая фармакология: антиэстрогены

Исключительно сложная проблема антигормонального действия может быть разделена на составляющие в соответствии с различными физиологическими уровнями.

Во-первых, понижение эстрадиола на уровне клеток-мишеней может быть достигнуто, например, фармакологическими или хирургическими приемами, понижающими или подавляющими продукцию эстрадиола яичниками. Другой способ, пока находящийся в стадии эксперимента [45], заключается в применении антител против эстрадиола, которые должны блокировать гормон еще до достижения им стадии клеточной реакции. И, наконец, гипотетически, если существует определенный механизм проникновения гормона в клетки-мишени [36], он может быть заторможен, что само по себе явится антиэстрогенным эффектом.

Другой возможностью является достижение антиэстрогенного эффекта в клетках-мишенях, что в конечном итоге предполагает действие на рецепторы, поскольку именно они являются единственными пока известными компонентами клеток, специфически узнающими гормоны. В этом случае можно рассматривать две возможности. Первая заключается в изменении концентрации рецептора гормона — ее уменьшение должно вызвать понижение чувствительности к эстрадиолу. Вторая — блокада функционирования рецепторов введением антигормона, который будет связываться центром r и в результате предотвращать эффект эстрадиола.

Первый подход вновь возвращает нас к физиологическим соображениям, уже обсуждавшимся ранее. Прогестерон не связывается с рецептором эстрадиола, но изменяет концентрацию соответствующих центров рецепторов, способных связывать эстрадиол. Пока еще неизвестно, действует ли прогестерон на синтез, дегградацию или активность рецептора эстрадиола.

Именно эффекту избыточного содержания эстрадиола по сравнению с прогестагеном приписывается наличие увеличивающегося числа случаев ракового поражения слизистой оболочки матки у женщин, применявших некоторые оральные контрацептивы. Мера безопасности в этом случае может быть дополнительный прием прогестерона женщинами, применяющими эстроген во время или после менопаузы. Вопрос этот, разумеется, сложен, поскольку прогестерон благодаря своему действию на оба типа рецепторов — для прогестерона и эстрадиола — понижает число своих собственных доступных центров связывания. В любом случае, однако, до того, как прогестаген сможет действовать по тому же точно механизму, что и прогестерон, он не должен связываться с рецептором эстрогена (чего не происходит в случае 19-портестостеронового ряда прогестагенов). И, наконец, мы не можем пока разграничить антиэстрогенный эффект прогестерона и его прямое прогестагенное действие, имеющее большое практическое значение.

Следует рассмотреть и вторую категорию антиэстрогенов, которые связываются по связывающим центрам рецепторов. Антиэстрадиольный эффект ряда слабых эстрогенов хорошо известен; к ним в первую очередь относятся классический эстриол, а также 16-оксо-эстрадиол и диметилстильбэстриол. Эти соединения, как отмечено выше, обладают более слабым сродством к рецептору, чем эстрадиол. После однократного введения эстриол находится в ядрах в течение короткого времени и у экспериментальных животных удается зарегистрировать лишь ранние маточные реакции — абсорбцию воды, гиперемию, повышенное включение аминокислот и нуклеотидов, раннюю активацию РНК-полимеразы и т. п. [12]. При введении в больших количествах одновременно с эстрадиолом эстриол оккупирует рецептор, вытесняя более активный гормон, и в результате дает выраженный антиэстрадиольный эффект. Однако с терапевтической и физиологической точек зрения проблему нельзя решить методом однократного введения эстриола, поскольку необходимо устранять или ослаблять эффект действия постоянно присутствующих эстрадиола или других эстрогенов. Постоянное применение слабого гормона ведет в конечном результате к замене одного гормона другим [24], а не к развитию антигормонального эффекта. В таком аспекте использование эстриола для предотвращения развития рака молочной железы не кажется достаточно аргументированным. Что же касается предложения применять 16-оксо-эстрадиол в качестве гормона или антигормона на уровне шейки матки, то недостаточное количество экспериментальных данных не позволяет нам обсудить этот вопрос.

Другая категория антиэстрогенных молекул состоит из синтетических нестероидных соединений типа трифенилэтилена, обладающих самыми различными свойствами. Недавно были проведены исследования эффекта тамоксифена в яйцеводе цыплят [53]. Действие высоких доз эстрадиолбензоата (1 мг/кг) на некоторые



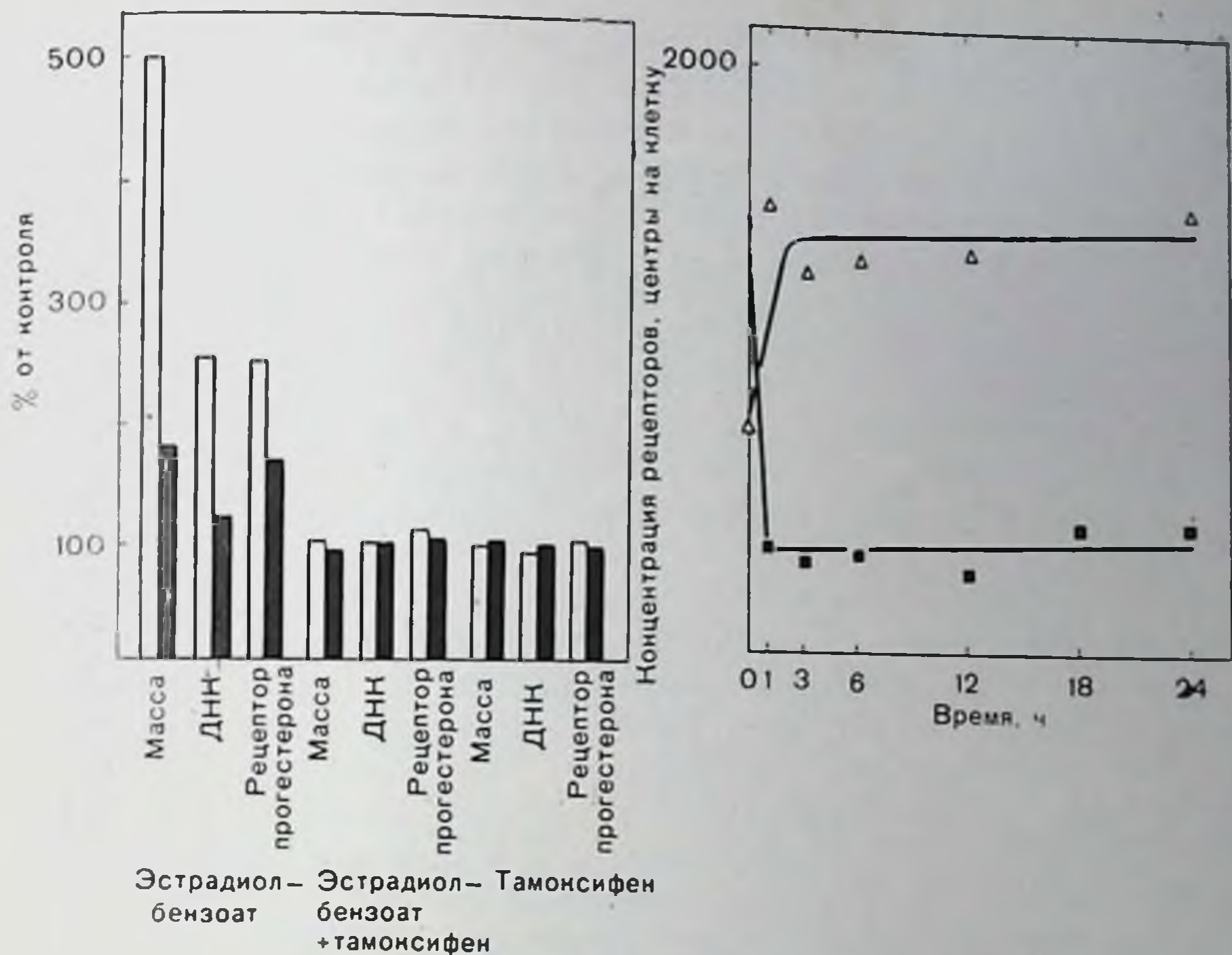


Рис. 37. Механизм действия «чистого» антиэстрогена — тамоксифена — на уровне яйцевода цыплят. На левой диаграмме со столбиками показан эффект эстрадиолбензоата (1 мг/кг), тамоксифена (10 мг/кг) и их смеси через 24 ч (черные столбики) и 72 ч (светлые столбики) после введения. Определяли массу животных, уровень ДНК и содержание цитоплазматического рецептора прогестерона (ЦРП). Кривые на правом графике показывают действие тамоксифена, введенного в момент времени 0, на содержание цитоплазматических (черные квадраты) и ядерных (светлые треугольники) рецепторов эстрадиола [53].

параметры яйцевода в сравнении с эффектом тамоксифена, измеренное через 24 и 72 ч после применения, показано на рис. 37. Увеличение соответствующих параметров значительно, а примененная доза эстрогена является гиперфизиологической. Тем не менее только 10-кратная доза эстрадиолбензоата по сравнению с дозой тамоксифена способна полностью блокировать его действие. В других соотношениях такая доза антиэстрогена эстрогенным свойством не обладает. Изучая действие тамоксифена на рецептор эстрадиола, мы установили, что рецептор переносится в ядра, достигая в них через 1 ч той же концентрации, что и под влиянием эстрадиола; при этом возвращение рецептора в цитоплазму не происходит по крайней мере в течение последующих 24 ч. Подобно этому мы наблюдаем коррелирующее понижение содержания цитоплазматического рецептора, продолжающееся в течение такого же времени. На рис. 37 показано, что в противоположность наблюдаемому в результате инъекции эстрадиола общее количество рецептора не увеличивается, что подтверждает отсутствие

агонистического эффекта. Этот примечательный результат указывает, что антагонистический эффект проявляется, по-видимому, за счет образования комплекса тамоксифен — рецептор, который, хотя и сохраняет способность достичь ядерного уровня, но не обладает способностью индуцировать эстрогенную активность, тогда как применяемый одновременно эстрадиол неактивен. Таким образом, наиболее подходящим объяснением может служить то, что вследствие аллостерического перехода под действием антагонистического лиганда комплекс тамоксифен — рецептор не способен достичь эффекторного центра, а в случае, если он достигает его, то блокирует эффект эстрадиола. Этот сложный и важный вопрос изучается в настоящее время в нашей лаборатории M. C. Lebeau, J. Mester и C. Geynet. Важность этого примечательного результата показана также и в неопубликованных данных C. Lazier, полученных на примере нафоксидина, который является практически чистым антагонистом в печени цыплят, где эстрадиол провоцирует синтез вителлогенина. Более того, тамоксифен представляет собой неэстрогенный антиэстроген при действии на обезьян (A. Walpole, частное сообщение) и на клетки рака молочной железы в культуре [27], а его применение в клинике при многочисленных случаях рака молочной железы не дает у подвергшихся лечению женщин выраженного эстрогенного эффекта (A. Walpole, частное сообщение).

Как известно, при использовании нафоксидина и тамоксифена в экспериментах на крысах и мышах получены различные результаты, что привело к созданию теории механизма действия антиэстрогенов; показано, однако, что эта теория частично неверна. Действительно, у грызунов (более выражено у мышей, чем у крыс) антагонистический эффект эстрадиола наблюдается только при условии, что он вводится вторым. На основании переноса рецептора в ядра [10] и коррелирующего понижения уровня цитоплазматического рецептора мы допускаем, что антиэстрогенный эффект является следствием понижения концентрации этого рецептора, приводящего к снижению восприимчивости к эстрадиолу [11].

Тот факт, что по непонятным пока причинам трифенилэтиленовые соединения являются частичными агонистами, осложняет детальный анализ проблемы, вообще достаточно сложной для изучения на грызунах.

Исключительный терапевтический интерес к соединению, которое одновременно является антиэстрогенным и не обладает совсем или отличается очень слабыми эстрогенными свойствами, трудно преувеличить, а тамоксифен обладает еще и таким важным качеством, как высокая толерантность для женщин. Следует, однако, подчеркнуть, что связывание антиэстрогенного соединения по связывающим центрам рецептора гормона будет одинаково сказываться на всех клетках-мишенях. Таким образом, все зависит от физиологических обстоятельств, количественной значимости соответствующей ткани и концентрации рецепторов, от метода

введения антиэстрогена и т. п. Следовательно, полная оценка этих фактов приведет к дальнейшему прогрессу в теоретическом отношении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные выше результаты позволяют пересмотреть на биофизической основе ряд фармакологических представлений, имеющих большое терапевтическое значение. Чувствительность к данному гормону действительно может зависеть от концентрации соответствующего рецептора в клетках-мишенях. Эта концентрация варьирует в физиологических условиях и может, вероятно, объяснить хотя бы частично некоторые гормональные взаимодействия и изменения чувствительности в процессе физиологических циклов. Изменения концентрации рецепторов могут, по-видимому, быть существенны для объяснения эффектов взаимного влияния гормонов. Одновременное присутствие различных рецепторов для одного и того же гормона или «конкуренция» разных гормонов за один и тот же рецептор указывают на интересное фармакологическое использование этих возможностей. Уже было показано, что характеристики рецепторов могут объяснить различия между природными гормонами типа эстрадиола и диэтилстильбэстролом. Ряд синтетических трифенилэтиленовых производных дает, по-видимому, возможность вызвать антагонистический эффект без сопутствующей эстрогенной активности, что имеет и потенциальное терапевтическое значение.

Регуляторные белки — рецепторы стероидных гормонов — представляют собой в определенных аспектах наиболее подходящие модели для физико-химического и физиологического подходов к решению фармакологических и терапевтических задач. Очистка и полная характеристика этих белков [46], получение антител [15] и молекулярно-биологические исследования [13, 49] несомненно приведут к дальнейшему прогрессу в клинической медицине.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alberga A., Baulieu E. E.* Concentration éleevative de l'oestradiol dans l'endometre chez la ratte. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1965, 261, 5226—5228.
2. *Anderson J., Clarck J. H., Peck E. J.* Oestrogen and nuclear binding sites. Determination of specific sites by <sup>3</sup>H-oestradiol exchanges. — *Biochem. J.*, 1972, 126, 561—567.
3. *Baudoin-Legros M., Meyer P., Worcel M.* Effects of prostaglandin inhibitors on angiotensin, oxytocin and prostaglandin F<sub>2α</sub> contractile effects on the rat uterus during the oestrous cycle. — *Br. J. Pharmacol.*, 1974, 52, 393—399.
4. *Baulieu E. E.* In: *Proceedings of the 4th International Congress of Endocrinology*, Washington, 1972, International Congress Series No. 273, ed. by R. O. Scow, 1973, p. 30—62. Excerpta Medica, Amsterdam.
5. *Baulieu E. E., Alberga A., Jung I.* Récepteurs hormonaux. Liaison de divers oestrogènes utérines. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1967, 265, 354—357.
6. *Baulieu E. E., Alberga A., Jung I., Lebeau M. C., Mercier-Bodard C., Milgrom E., Raynaud J. P., Raynaud-Jammet C., Rochefort H., Truong H., Ro-*

- bel P.* Metabolism and protein binding of sex steroids in target organs: An approach to the mechanism of hormone action. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1971, 27, 351—419.
7. *Baulieu E. E., Alberga A., Raynaud-Jammet C., Wira C. R.* New Look at the very early steps of oestrogen in uterus. — *Nature (New Biol.)*, 1972, 236, 236—239.
  8. *Baulieu E. E., Atger M., Best-Belpomme M., Corvol P., Courvalin J. C., Mester J., Milgrom E., Robel P., Rocheford H., De Catalogne D.* Steroid hormone receptors. — *Vitam. Horm.*, 1975, 33, 649—731.
  9. *Bayard F., Damilano S., Robel P., Baulieu E. E.* Récepteurs de l'oestradiol et de la progestérone dans l'endomètre humain au cours du cycle menstruel. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1975, 281, 1341—1344.
  10. *Capony F., Rocheford H.* In vivo effect of antioestrogens on the localisation and replenishment of estrogen receptor. — *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1975, 3, 233—251.
  11. *Clarck J. H., Peck E. J., Anderson J. N.* Oestrogen receptors and antagonism of steroid hormone action. — *Nature*, 1974, 251, 446—448.
  12. *Clarck J. H., Paszko Z., Peck E. J.* Nuclear binding and retention of the receptor estrogen complex: Relation to the agonistic and antagonistic properties of estriol. — *Endocrinology*, 1977, 100, 91—96.
  13. *Courvalin J. C., Bouton M. M., Baulieu E. E., Nuret P., Chambon P.* Effect of estradiol on rat uterus DNA-dependent RNA polymerase: Studies on solubilized enzymes. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 4843—4849.
  14. *Fanestil D. D., Edelman I. S.* Characteristics of the renal nuclear receptors for aldosterone. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 872—879.
  15. *Fox L. L., Redeuilh G., Baskevitch P., Baulieu E. E., Richard-Foy H.* Production and detection of antibodies against the estrogen receptor from calf uterine cytosol. — *FEBS Lett.*, 1976, 63, 71—76.
  16. *Garcia M., Rocheford H.* Androgens on the estrogen receptor. Correlation between nuclear translocation and uterine protein synthesis. — *Steroids*, 1976, 29, 111—126.
  17. *Glasscock R. K., Hoekstra W. G.* Selective accumulation of tritium-labelled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. — *Biochem. J.*, 1959, 72, 673—675.
  18. *Gorski J., Toft D., Shyamala G., Smith D., Notides A.* Hormones receptors: Studies on the interaction of estrogen with the uterus. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1968, 24, 45—80.
  19. *Huggins C.* Endocrine-induced regression of cancers. — *Science*, 1967, 156, 1050—1054.
  20. *Jensen E. V., Jasobson H. I.* Basic guides to the mechanism of estrogen action. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1962, 18, 387—414.
  21. *Jensen E. V., Suzuki T., Kawashima T., Stumpf W. E., Jungblut P. W., De Sombre E. R.* A two-step mechanism for the interaction of oestradiol with the rat uterus. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, 59, 632—638.
  22. *Jung I., Baulieu E. E.* Plusieurs récepteurs par cellule pour la même et pour différentes hormones stéroïdes. Conséquences pharmacologiques possibles. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1974, 279, 671—674.
  23. *Kahn C. R.* Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. — *J. Cell. Biol.*, 1976, 70, 261—281.
  24. *Lan N. C., Katzenellenbogen B. S.* Temporal relationships between hormone receptor binding and biological responses in the uterus: Studies with short- and long-acting derivatives of estriol. — *Endocrinology*, 1976, 98, 220—227.
  25. *Lebeau M. C., Massol N., Baulieu E. E.* An insoluble receptor for oestrogens in the "residual nuclear proteins" of chick-liver. — *Eur. J. Biochem.*, 1973, 36, 294—300.
  26. *Lebeau M. C., Massol N., Baulieu E. E.* Extraction, partial purification and characterization of "the insoluble estrogen receptor" from chick liver nuclei. — *FEBS Lett.*, 1974, 46, 107—111.
  27. *Lippman M., Bolan G., Huff K.* The effects of oestrogens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture. — *Cancer Res.*, 1976, 36, 4595—4601.

28. *McGuire W. L., Carbone P. P., Vollmer E. P.* In: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer. Raven Press, New York, 1975.
29. *McGuire W. L., Huff K., Jennings A., Chamness G. C.* Mammary carcinoma: A specific biochemical defect in autonomous tumors. — *Science*, 1972, 175, 335—336.
30. *Mercier-Bodard C., Alfsen A., Baulieu E. E.* Sex steroid binding plasma protein (SBP). — *Acta Endocrinol. (Suppl. 147)*, 1970, 64, 204—224.
31. *Mester J., Baulieu E. E.* Dynamics of estrogen receptor distribution between the cytosol and nuclear fractions of immature rat uterus following oestradiol in administration. — *Biochem. J.*, 1975, 146, 617—623.
32. *Mester J., Baulieu E. E.* Progesterone receptors in the chick oviduct: Determination of the total concentration of binding sites in the cytosol and nuclear fraction and effect of progesterone on their distribution. — *Eur. J. Biochem.*, 1977, 72, 405—414.
33. *Mester J., Martel D., Psychoyos A., Baulieu E. E.* Hormonal control of oestrogen receptor in uterus and receptivity for ovoimplantation in the rat. — *Nature*, 1974, 250, 776—778.
34. *Milgrom E., Atger M., Baulieu E. E.* Progesterone in uterus and plasma. Progesterone receptor(s) in guinea pig uterus cytosol. — *Steroids*, 1970, 16, 741—754.
35. *Milgrom E., Atger M., Baulieu E. E.* Acidophilic activation of steroid hormone receptors. — *Biochemistry*, 1973, 12, 5198—5205.
36. *Milgrom E., Atger M., Baulieu E. E.* Studies on estrogen entry into uterine cells and on estradiol-receptor complex attachment to the nucleus. Is the entry of estrogen into uterine cells a protein-mediated process? — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 320, 267—283.
37. *Milgrom E., Atger M., Perrot M., Baulieu E. E.* Progesterone in uterus and plasma. Uterine progesterone receptors during the estrus cycle and implantation in the guinea pig. — *Endocrinology*, 1972, 90, 1071—1078.
38. *Milgrom E., Baulieu E. E.* Progesterone in the uterus and the plasma. The role of hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 40, 723—730.
39. *Milgrom E., Luu Thi M., Atger M., Baulieu E. E.* Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 6366—6374.
40. *Mohla S., de Sombre E. R., Jensen E. V.* Tissue-specific stimulation of RNA synthesis by transformed estradiol-receptor complex. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 661—667.
41. *O'Malley B. W., Toft D. O., Sherman M. R.* Progesterone receptors in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, 501—509.
42. *Pietras R. J., Szego C. M.* Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. — *Nature*, 1977, 265, 69—72.
43. *Raynaud-Jammet C., Baulieu E. E.* Action de l'oestradiol in vitro: Augmentation de la biosynthese d'ARN dans les noyaux uterins. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1968, 268, 3211—3214.
44. *Raynaud-Jammet C., Catelli M., Baulieu E. E.* Inhibition by amanitin of the oestradiol-induced increase in  $\alpha$ -amanitin insensitive RNA polymerase in immature rat uterus. — *FEBS Lett.*, 1972, 22, 93—96.
45. *Raziano J., Ferin M., Vande Wiele R. L.* Effects of antibodies to estradiol-17 $\beta$  and to progesterone on nidation and pregnancy in rats. — *Endocrinology*, 1972, 90, 1133—1138.
46. *Richard-Foy H.* These de doctorat es-Sciences, Paris VI, Mai, 1977.
47. *Rocheport H., Baulieu E. E.* Recepteurs hormonaux relations entre les "recepteurs" uterins de l'pestradiol "8S" cytoplasmique et "4S" cytoplasmique et nucleaire. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1968, 267, 661—665.
48. *Rocheport H., Garcia M.* Androgen on the estrogen receptor. Binding and in vivo nuclear translocation. — *Steroids*, 1976, 28, 549—560.
49. *Schimke R. T., Pennequin P., Robins D., McKnight G. S.* In: Hormones and Cell Regulation, European symposium, ed. by J. Dumont, J. Nunez, 1977, v. 1, p. 209—221, North Holland Publishing Company, Amsterdam.

50. Schmelck P. H., Lebeau M. C., Baulieu E. E. Synergistic and antagonistic effects of progesterone and oestrogen on oestrogen receptor concentration and DNA polymerase activity in chick oviduct. — FEBS Lett., 1977, 79, 253—257.
51. Sutherland R. L., Baulieu E. E. Quantitative estimates of cytoplasmic and nuclear oestrogen receptors in chick oviduct. Effect of oestrogen on receptor concentration and subcellular distribution. — Eur. J. Biochem., 1976, 70, 531—541.
52. Sutherland R. L., Mester J., Baulieu E. E. In: Hormones and Cell Regulation, European symposium, ed. by J. Dumont, J. Nunez, 1977, v. 1, p. 31—48. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
53. Sutherland R. L., Mester J., Baulieu E. E. Tamoxifen is a potent "pure" antioestrogen in chick oviduct. — Nature, 1977, 267, 434—435.
54. Talwar G. P., Segal S. J., Evans A., Davidson O. W. The binding of estradiol in the uterus: A mechanism for depression of RNA synthesis. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1964, 52, 1059—1066.
55. Toft D., Gorski J. A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 1574—1581.
56. Toft D., Shyamala G., Gorski J. A receptor molecule for estrogens: Studies using a cell free system. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1967, 57, 1740—1743.
57. Tseng L., Gupride E. Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. — J. Clin. Endocrinol., 1975, 41, 404.

**РЕЦЕПТОРЫ ЭСТРОГЕНОВ В МАТКЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ  
С ГЕПАРИНОМ И ОЧИСТКА ЦИТОЗОЛЬНОГО РЕЦЕПТОРА**

ДЖОВАННИ АЛЬФРЕДО ПУКА, АННА МАРИЯ МОЛИНАРИ,  
НИКОЛЯ МЕДИЧИ, БРУНО МОНШАРМОН  
(GIOVANNI ALFREDO PUCA, ANNA MARIA MOLINARI,  
NICOLA MEDICI, BRUNO MONSHARMONT)

*Институт общей патологии, Школа медицины и хирургии,  
Университет Неаполя, Неаполь, Италия*

В соответствии с современными воззрениями стероидные гормоны действуют, связываясь со специфическими рецепторными белками, присутствующими в клетках-мишенях для этих гормонов. Хотя общая схема взаимодействия стероидов с клетками и разработана, точный механизм, по которому стероиды действуют на синтез РНК и белка, пока еще остается неясным. Существует много указаний на то, что ядра являются первичным центром действия стероидных гормонов, где они, по-видимому, регулируют или стимулируют транскрипцию гена; однако высказаны предположения, что стероидные гормоны могут также оказывать и более прямое влияние на посттранскрипционные процессы, вовлеченные в экспрессию генов [13, 19, 23, 26]; другими словами, местом их действия может быть внеядерный компартмент. В матке были идентифицированы различные формы рецептора эстрогенов: а) нативный рецептор, локализованный во внеядерном пространстве клетки, который характеризуется обратимым изменением седиментации в градиенте сахарозы с 8 до 4S при повышении концентрации соли с 0,1 до 0,4 М [21]; б) производный цитозольный рецептор, седиментирующий при 4S в высокой или низкой концентра-

ции соли и получаемый из «нативного» рецептора при активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым ферментом [16]; в) ядерный рецептор, представляющий собой форму рецептора, мигрирующую из цитозоля в ядро после образования комплекса гормон — рецептор [9]. Возможно, что каждая из форм предназначена для выполнения специальных функций.

В настоящем разделе будут описаны свойства, которые характерны для нативной формы рецептора, в частности его способность специфически взаимодействовать с гепарином, ковалентно связанным с сефарозой. Это свойство позволяет легко осуществлять очистку рецептора и может также отражать некие важные и ранее неизвестные физиологические функции.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

Все использованные реагенты имели аналитическую степень чистоты.  $17\beta$ - $^3\text{H}$ -эстрадиол с активностью 41 Ки/мМ был получен от фирмы «Amersham», нерадиоактивные стероиды — от «Steraloids». Трис(оксиметил)аминометан(трис) и гепарин типов I и II были продуктами фирмы «Sigma», дитиотрейтол — фирмы «Calbiochem», сефадекс G-25, G-100 и G-200, сефароза С14В и голубой декстран 2000, а также декстрансульфат получены от фирмы «Pharmacia», ДЭАЭ-целлюлоза (ДЭ-52) — от фирмы «Whatman», сахароза марки «осч» — от фирмы «Schwarz/Mann», акриламид, N,N-метиленбисакриламид (бис), N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин, кумасси яркий голубой, персульфат аммония, додецилсульфат натрия (ДДС) — от фирмы «Bio-rad», бромциан — от фирмы «Eastman-Kodak», хондронинсульфат — от фирмы «Serva».

Стандартные макромолекулы для определения радиуса Стокса и молекулярной массы представляли собой глобулин, человеческий гамма-глобулин, овальбумин, рибонуклеазу фирмы «Calbiochem», бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Miles», альдолазу и каталазу фирмы «Serva», фосфоорилазу А фирмы «Sigma», трансферрин человека фирмы «Behringwerke».

Необходимые численные значения взяты из литературы [12, 25].

### Буферные растворы

Использовали следующие буферные растворы: буфер А — трис, 20 мМ, рН 7,5, дитиотрейтол, 1 мМ, этилендиаминтетрауксусная кислота, 0,5 мМ; буфер Б — то же, что и А, но дополнительно  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ. При необходимости добавляли другие соли, что отмечено в тексте. рН измеряли при 20° С.

### Аффинная агароза

Гепарин (Sigma, марка II) или хондронинсульфат растворяли в концентрации 2 мг/мл в 0,1 М бикарбоната натрия, рН 8,5, и подвергали взаимодействию с бромцианактивированной сефаро-

зой С14В (300 мг бромциана на 1 мл геля) по методу Cuatrecasas [6]. На каждый миллилитр раствора лиганда использовали 1 г агарозы. Количество несвязавшегося с агарозой лиганда определяли по карбазольной реакции на мочевую кислоту [3].

### Животные

Матки телят получали с бойни, проверяли их способность специфически связывать эстрадиол, замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  и использовали в эксперименте в течение 2 нед с момента выделения, поскольку даже при такой низкой температуре происходит потеря эстрадиолсвязывающей активности.

### Препараты цитозоля, определение связанного гормона, центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, электрофокусирование и хроматографические процедуры

Перечисленные процедуры выполняли в соответствии с ранее описанными рекомендациями [15]. Для того чтобы избежать агрегации рецепторов эстрадиола в процессе хроматографии на сефадексе G-200, до нанесения образца к уравнивающему колонки буферному раствору добавляли гепарин в количестве 0,1 мг/мл. Объем буфера, содержащего гепарин, составлял  $\frac{1}{4}$  от общего объема колонки. Вследствие разницы в молекулярных массах рецептор элюировался с колонки до гепарина.

### Эксперименты по изучению специфичности гормона

Специфичность связывания гормона изучали в соответствии с неопубликованным методом, основанным на обратимой диссоциации комплекса эстрадиол — рецептор в присутствии неденатурирующих концентраций NaSCN. Комплекс гормон — рецептор вносили в 0,5 M NaSCN и инкубировали в присутствии избытка различных стероидов и  $3 \cdot 10^{-9}$  M [ $^3\text{H}$ ]-эстрадиола в течение 20 мин при  $24^{\circ}\text{C}$  и 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$ . Затем образцы фильтровали через стандартную [15] колонку с сефадексом G-25; неспецифическое связывание после нагревания в течение 5 мин при  $60^{\circ}\text{C}$  [15].

### Получение ядерного рецептора крыс

Ядерные рецепторы выделяли из 10 крыс, у которых за 1 нед до этого хирургическим путем были удалены яичники. Перед выделением рецепторов крысам внутрибрюшинно вводили 1 мкг холодного эстрадиола и через 2 ч умерщвляли. Исходную ядерную фракцию (800 g) промывали 3 раза и в течение 40 мин при  $0^{\circ}\text{C}$  экстрагировали 3 мл 0,25 M NaSCN. Такая процедура более эффективна, чем обычная экстракция с помощью KCl [14]. После центрифугирования в течение 1 ч при 105 000 g к фракции рецептора добавляли  $3 \cdot 10^{-8}$  M [ $^3\text{H}$ ]-эстрадиол и определяли обмен гормона, как указано в предыдущем разделе.



## Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез в полиакриламидном геле в недиссоциирующих условиях проводили по методу [7] в системе из диэтилбарбитуровой кислоты и триса, рН 7,0—7,2, концентрация акриламида 5—9%, соотношение акриламид/бис во всех случаях было 30:1. Колонки (трубки геля с внутренним диаметром 5 мм и длиной 62 мм) выдерживали при 4°С и токе 2 мА в стандартном аппарате «Page Pharmacia». В качестве проявляющего красителя использовали бромфеноловый синий. Для того чтобы обеспечить проникновение рецептора в гель, к буферному раствору добавляли гепарин в количестве 0,1 мг/мл. По окончании электрофореза столбики геля разрезали на диски толщиной 2 мм, растворяли в 5 мл толуола, содержащего РРО и РОРОР, в течение 12 ч и просчитывали раствор на счетчике LS 3150-T Beckman. Выделение радиоактивности составляло 80—100%. Из-за присутствия гепарина визуализация белков может быть достигнута только методом [4], имеющим малую чувствительность. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДДС проводили по методу [25] в геле, состоящем из 10% акриламида и 0,15% бис. Белки преинкубировали при 37°С в течение 2 ч в 1% β-меркаптоэтанол в 10 мМ фосфатном буфере. Электрофорез проводили при 24°С и токе 3 мА в столбиках геля с внутренним диаметром 3 мм и длиной 100 мм. Гели прокрашивали в 0,25% кумасси голубом в растворе, содержащем 50% метанола и 10% уксусной кислоты, в течение 2 ч, а удаление красителя производили электрофоретически в растворе, содержащем 5% метанола и 7,5% уксусной кислоты.

### Определение белка

Белки определяли по методу Lowry с теми модификациями, которые необходимы при наличии в системе сульфгидрильных реагентов [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Взаимодействие рецептора эстрадиола с гепарин-агарозой

За связыванием комплекса гормон — рецептор за гепарин-сефарозой следили периодически, измеряя связанную с рецептором радиоактивность, остающуюся в супернатанте после осаждения соответствующих компонентов центрифугированием при 2000 об/мин. Промывание агарозного осадка буфером А в 0,1 М КСI приводит к выделению дополнительно лишь 2—3% неспецифически связанного комплекса, поэтому стадию промывания в дальнейшем опускали. В случае, когда концентрации гепарин-агарозы варьировались при постоянном объеме цитозоля, 80—90% комплекса эстрадиол — рецептор связываются с агарозой при 0°С в течение 1 ч, если соотношение агарозы и цитозоля находится в

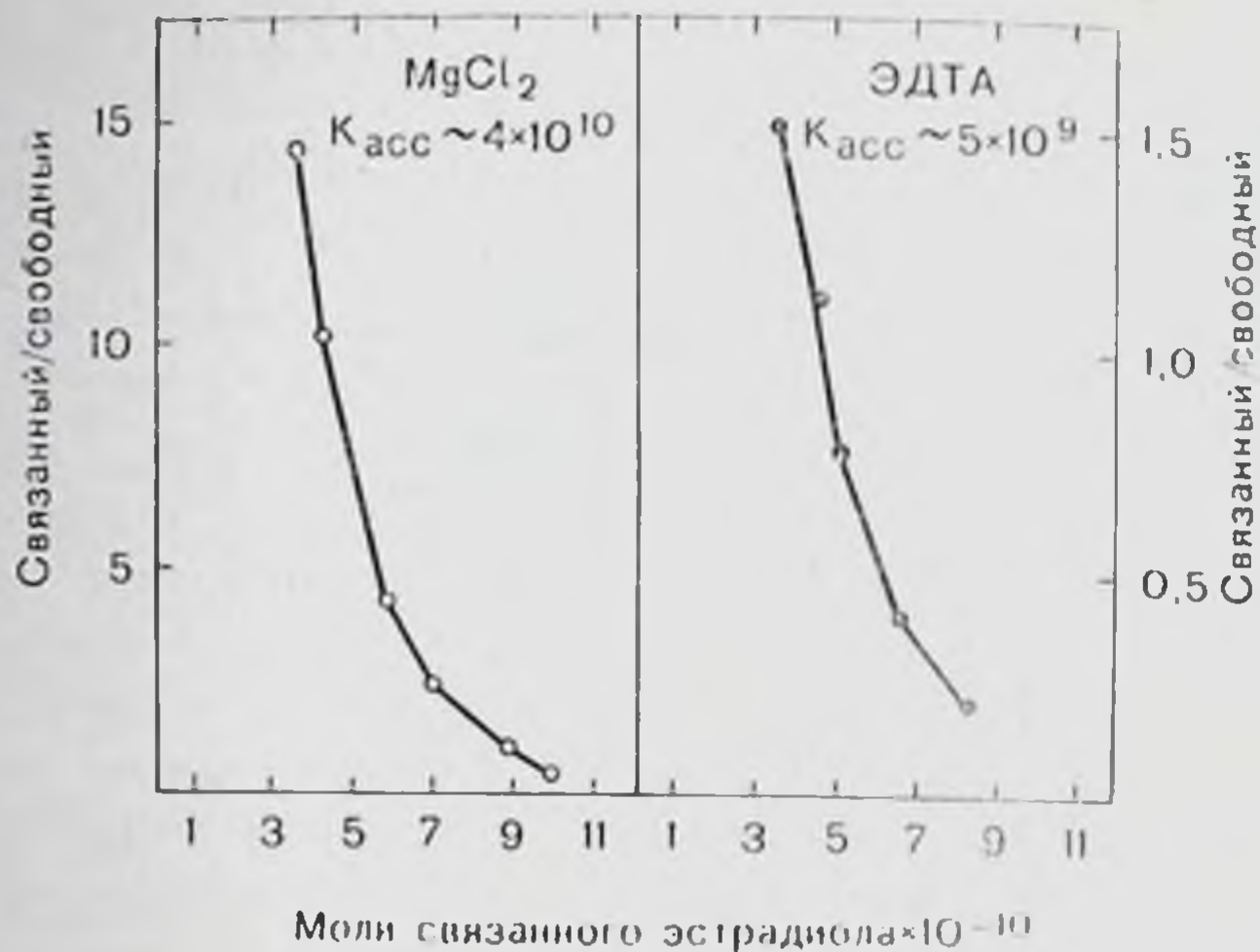


Рис. 38. Взаимодействие между комплексами эстрадиол-рецептор и гепарин-агарозой.

К одинаковому количеству (100 мг) набухшего геля гепарин-агарозы добавляли возрастающие количества меченого цитозоля до конечного объема 2 мл в присутствии (светлые кружки) или в отсутствие (черные кружки) 5 мМ  $MgCl_2$ . По истечении 90 мин инкубации при слабом перемешивании и  $0^\circ C$  проводили осаждение геля и определяли остающуюся в растворе радиоактивность.

пределах 1 : 10 (иными словами, 100 мг набухшего геля на 1 мл цитозоля). Хотя при повышенных температурах максимальное связывание достигается быстрее (80% комплекса связывается только за 6 мин при  $30^\circ C$  и за 15 мин при  $20^\circ C$ ), а достижение той же степени связывания при  $4^\circ C$  требует гораздо больше времени, для всех экспериментов была выбрана температура  $0^\circ C$ . Связывание рецептора с гепарин-агарозой в значительной степени зависит от ионной силы;  $NaSCN$  представляет собой наиболее эффективный ингибитор связывания (50% ингибирования при концентрации 0,15 М); более слабыми ингибиторами являются  $NaCl$ ,  $KCl$  и  $KBr$  (50% ингибирования при концентрации 0,22 М). Значительная стимуляция связывания наблюдается в присутствии различных катионов. Среди использованных катионов  $Mn^{2+}$  является наиболее эффективным (максимальная стимуляция при концентрации 2 мМ); менее эффективны  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  и  $Fe^{2+}$ . Катионы повышают константу ассоциации между гепарин-агарозой и комплексом гормон — рецептор примерно в 10 раз — от  $5 \cdot 10^{-9}$  в 0,5 М ЭДТА до  $4 \cdot 10^{10}$  в 5 мМ  $MgCl_2$  (рис. 38). Хотя присутствие эстрадиола и не требуется для иммобилизации рецептора на колонках гепарин-сефарозы, определение сродства в периодических экспериментах указывает на некоторую зависимость этого взаимодействия от эстрадиола. Хондритинсульфат, будучи связанным с сефарозой, совершенно не обладает способностью связывать комплекс рецептор — эстрадиол или рецептор сам по себе. Элюирование связанного комплекса эстрадиол — рецептор или не содержащего эстрадиол рецептора с гепарин-агарозы достигается повышением ионной силы буферного раствора более 0,2 М

(NaCl, KCl, KBr, NaSCN) или добавлением 1M гуанидинхлорида или гепарина (марки 1). ЭДТА в концентрации до 100 мМ или катионы в концентрации 1–50 мМ не оказывают влияния на элюирование и не изменяют условий его в присутствии гепарина или солей.

Обнаружено, что высокие концентрации соли оказывают вредное воздействие на комплекс эстрадиол — рецептор, который в результате приобретает тенденцию к диссоциации, а также на эстрадиолсвязывающую активность свободного рецептора, понижая ее на 50% за 12 ч. Более быстрая и полная элюция достигается, если колонку набивают гепарин-сефарозой после стадий адсорбции и промывания. Хондроитинсульфат и декстрансульфат абсолютно неэффективны в элюировании связанного рецепторного белка.

### Молекулярные формы рецептора, взаимодействующие с гепарин-агарозой

Результаты анализа в градиенте сахарозы цитозоля до и после взаимодействия с гепарин-агарозой приведены на рис. 39, А. Видно, что нативный 8S-рецептор после контактирования с гепарин-

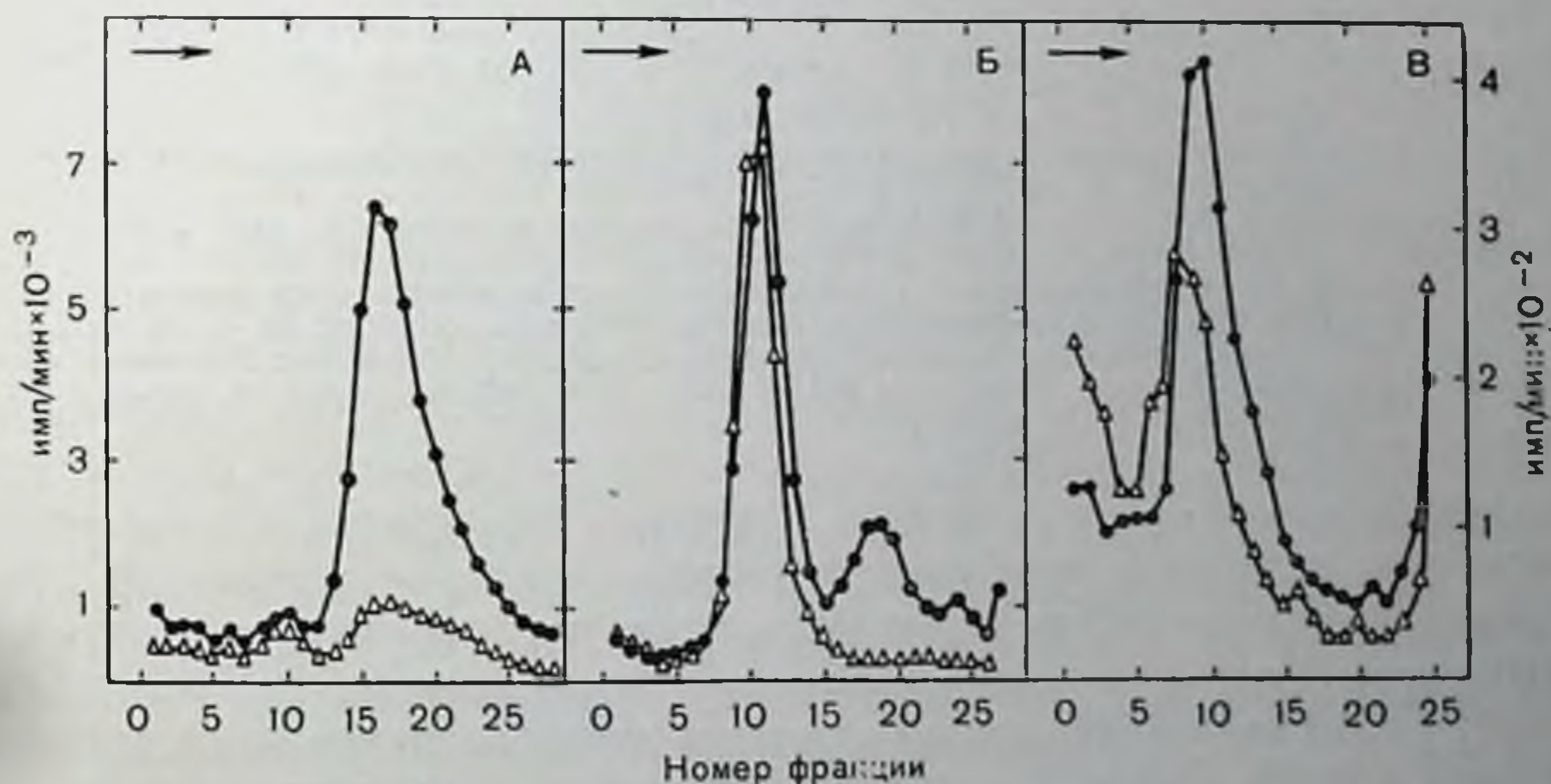
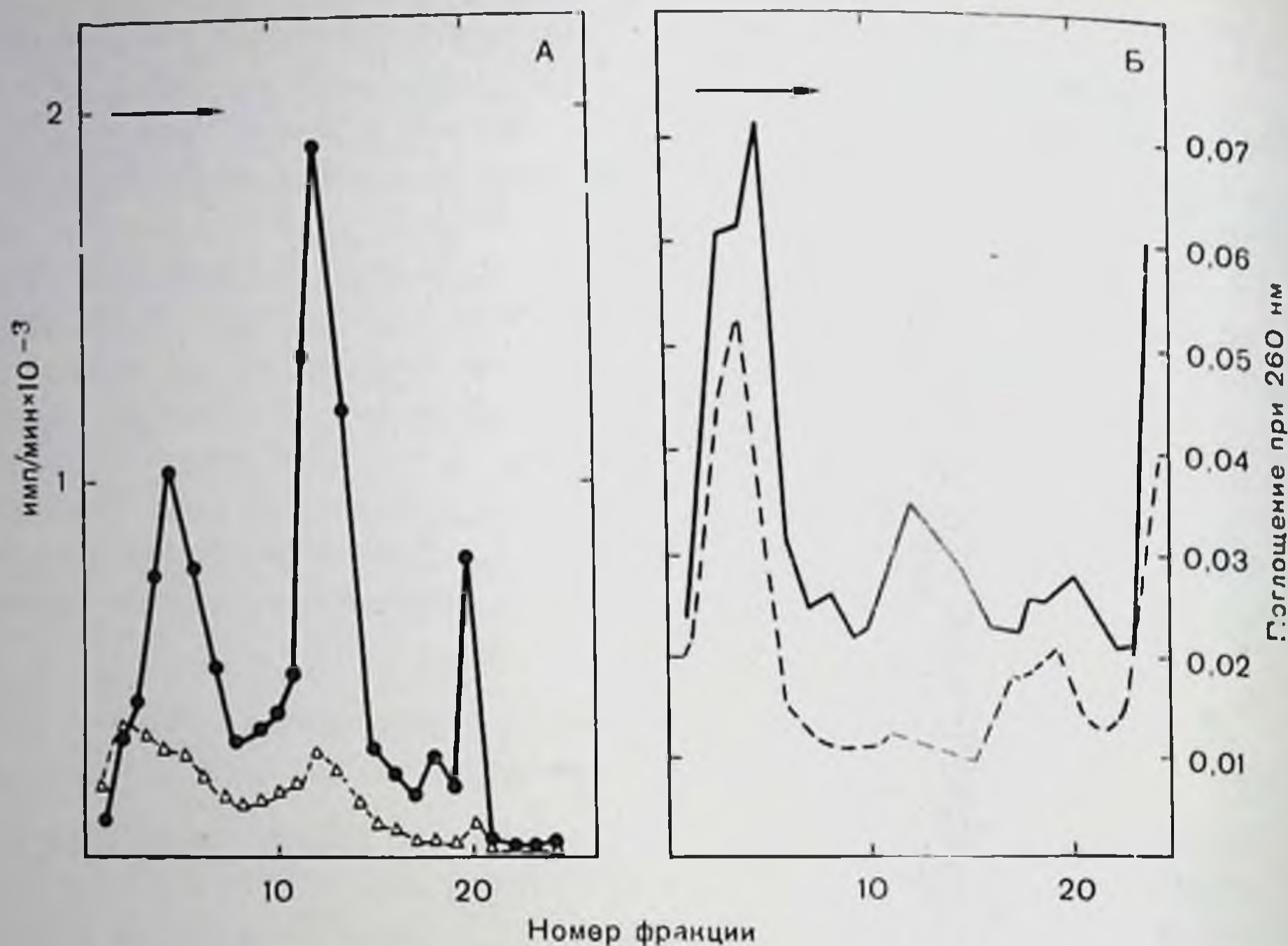


Рис. 39. Анализ в градиенте плотности сахарозы нативных, модифицированных и ядерных рецепторов до (черные кружки) и после (светлые треугольники) инкубации с гепарин-агарозой.

А — 0,3 мл предварительно помеченного цитозоля наслаивали на градиент сахарозы без или после инкубации с гепарин-агарозой в течение 1 ч при 0 °С и при соотношении массы геля и объема цитозоля 1:10; Б — 10 мл меченого цитозоля инкубировали в 0,6 М KCl и 4 мМ CaCl<sub>2</sub> для активации ФТР [16]. После 1 ч инкубации при 0 °С образец осаждали 30% сульфатом аммония, осадок суспендировали в 4 мл буферного раствора А в 0,05 М KCl и диализовали на колонке с сефадексом С-25, уравновешенной буферным раствором А; 0,2 мл диализованного образца наслаивали на градиент плотности сахарозы без или после обработки гепарин-агарозой в течение 30 мин при 0 °С. Как следует из количества стабильной при малых концентрациях соли фракции с коэффициентом седиментации 4S, трансформация происходит на 70%. Контрольный эксперимент без добавления CaCl<sub>2</sub> показал, что большая часть связанной радиоактивности исчезает из градиента после инкубации с гепарин-агарозой; В — 0,2 мл ядерного рецептора наслаивали на градиент сахарозы и следующих условиях: 10–30% градиент сахарозы в буферном растворе А и 11 ч центрифугирования при 2 °С и 55 000 об/мин на роторе SW 60 T1 в ультрацентрифуге L5-75 Beckman.



**Рис. 40.** Анализ в градиенте плотности сахарозы цитоплазматического рибонуклеопротеинового комплекса рецептора [10] до или после инкубации с гепарин-агарозой.

А — 15 мл меченого цитозоля осаждали 40% сульфатом аммония, осадок суспендировали в 1,5 мл буфера А, 0,1 М КСl и анализировали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной буфером А, 0,1 М КСl. Днализоваанный образец (0,3 мл) насланвали на градиент сахарозы без (черные кружки или сплошная линия) или после (светлые треугольники или пунктирная линия) инкубации с гепарин-агарозой в течение 30 мин при 0 °С. На графике показана радиоактивность фракций; Б — в том же эксперименте определена оптическая плотность фракций при 260 нм. Условия: 10–34% градиента сахарозы в буфере А, 0,1 М КСl, центрифугирование в течение 3 ч при 2 °С и 50 000 об/мин на роторе SW 60 Ti в ультрацентрифуге L5-75 Beckman.

агарозой исчезает из цитозоля. Свойство связываться с гепарин агарозой нативный рецептор сохраняет и после очистки. В противоположность этому трансформация нативного рецептора под действием  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого фактора трансформации рецептора (ФТР) [16] вызывает полную потерю этого свойства, как следует из рис. 39, Б. После инкубации образца с гепарин-агарозой из него исчезают седиментирующие по направлению к концу градиента остаточный 8S-рецептор и более крупные молекулы, меченные [<sup>3</sup>H]-эстрадиолом; в то же время в нем остается стабильный к действию низкой концентрации соли производный 4,5S-рецептор.

Поскольку мы постулировали, что трансформация под действием ФТР важна для миграции комплекса эстрадиол — рецептор в ядро [16], было интересно выяснить, как ведет себя по отношению к гепарин-агарозе ядерный рецептор: подобно нативному 8S-рецептору или производному от него 4,5S-рецептору. Как следует из рис. 39, В, ядерный рецептор крыс, выделенный после инъекции экспериментальным животным физиологических доз эстрадиола, не взаимодействует с гепарин-агарозой. Более того, 80% крыси-

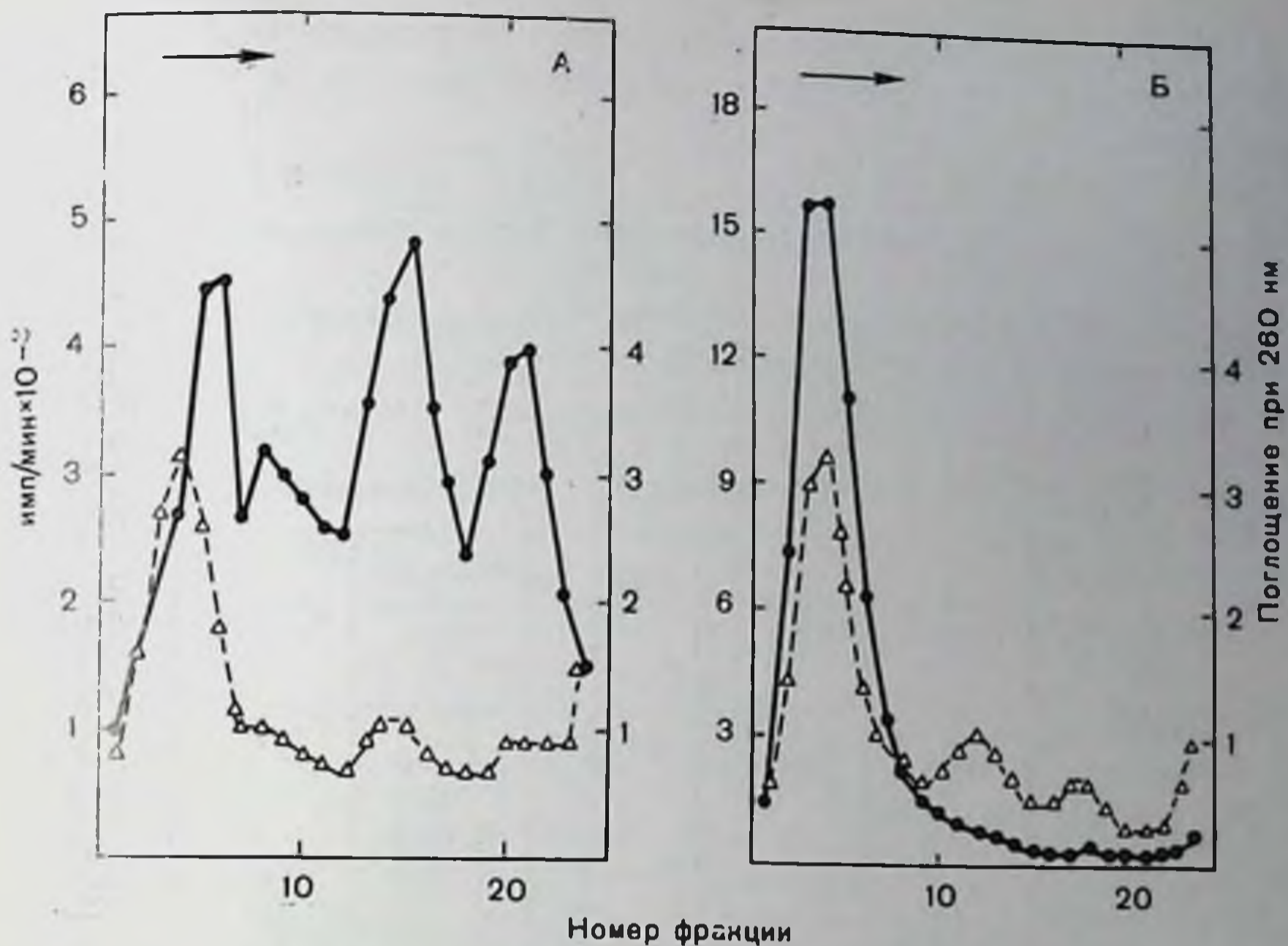


Рис. 41. Действие гепарина и хондроитинсульфата на комплекс рецептора с рибонуклеопротеинами.

Меченый цитозоль (16 мл) осаждали 40% сульфатом аммония, осадок суспендировали в 1,5 мл буфера А, 0,1 М КСl, содержащем 3 мг/мл хондроитинсульфата (А) или 3 мг/мл гепарина (Б). После инкубации в течение 30 мин при 0 °С растворившиеся осадки диализовали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной буфером А, 0,1 М КСl. Диализованный образец (0,2 мл) наслаивали на градиент сахарозы и определяли радиоактивность (черные кружки) или оптическую плотность (светлые треугольники) при 260 нм. Условия: 10—34% градиента сахарозы в буфере А, 0,1 М КСl, центрифугирование в течение 4 ч при 40 000 об/мин и 2 °С на роторе SW 60 Ti в ультрацентрифуге L5-75 Beckman.

ного цитозоля, подвергнутого такой же обработке высокой концентрацией соли и температурой, как и ядерный рецептор, связывается маленькой колонкой гепарин-агарозы, тогда как 91% ядерного рецептора проходит через эту колонку, не задерживаясь. В то же время все три типа рецепторов не демонстрируют различий при взаимодействии с фосфоцеллюлозой.

Цитоплазматический комплекс рибонуклеопротеин — рецептор также связывается с гепарин-агарозой. На рис. 40, А показано, что не только пик радиоактивности, соответствующий 8S-рецептору (фракции 3—8), но также и тяжелее седиментирующие пики радиоактивности, соответствующие, по данным Liang и Liao [10], ассоциатам комплекса гормон — рецептор с цитоплазматическими рибонуклеопротеинами, исчезают после прохождения через гепарин-агарозу. Из двух пиков самого рибонуклеопротеина, поглощающего при 260 нм, только первый заметно уменьшается после контактирования с гепарин-агарозой (рис. 40, Б). Гепарин, но не хондроитинсульфат (рис. 41) и не декстрансульфат, полностью освобождает комплекс эстрадиол — рецептор от рибонуклеопротеинов.

Производный рецептор, получаемый в результате действия ФТР, вообще не ассоциирует с цитоплазматическими рибонуклеопротеинами.

### Очистка нативной формы рецептора эстрадиола

Взаимодействие нативного рецептора эстрадиола с гепарин-агарозой может быть использовано для очистки этой формы рецептора. Данные эксперимента по такой очистке приведены в табл. 15.

Таблица 15. Очистка комплекса эстрадиол—рецептор

Стадия	Объем, мл	Общий белок, мг	Общая радиоактивность $\text{dpm} \cdot 10^{-6}$	Удельная активность $\text{dpm} \cdot 10^{-3} / \text{мг}$	Выход*, %	Степень очистки**, раз
1. Цитозоль	900	6480	445	68	100	1
2. Гепарин-агароза	27	32	258	8057	58	118
3. Сефадекс G-200	108	7,6	139	18224	31	258
4. ДЭАЭ-целлюлоза	85	1,2	90	75083	20	1104
5. Сефадекс G-200	50		60		14	—
I пик	26		24,8		5,5	
II пик	22		33,8		7,6	

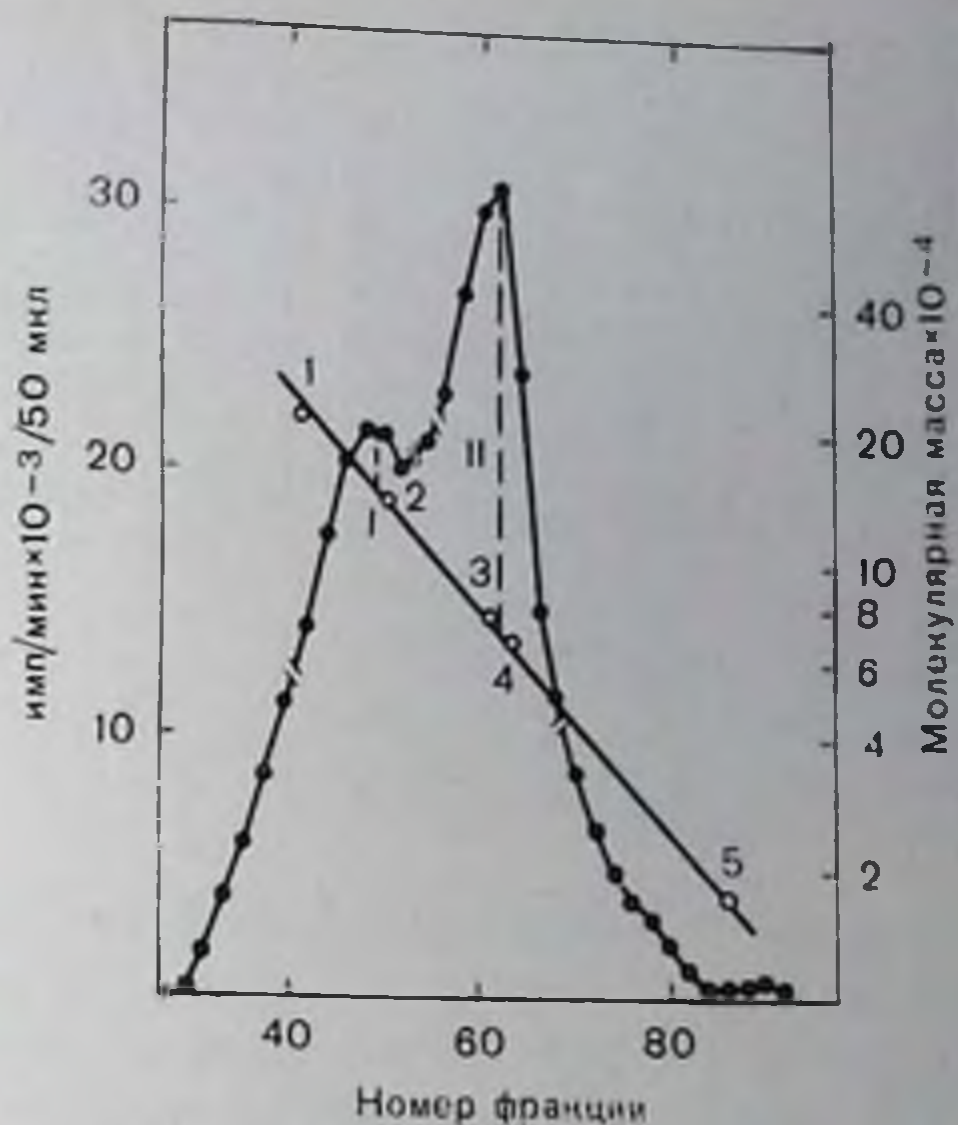
\* Без учета материала, который использовался для анализа или по тем или иным причинам не поступил на следующую стадию.

\*\* Без учета количества комплекса, с неизбежностью диссоциирующего в процессе хроматографии.

900 мл цитозоля из 250 г ткани матки были разделены на три порции по 300 мл; в действительности мы получили три последовательных порции после ультрацентрифугирования в высокоскоростной ультрацентрифуге 50,2 Ti Spinco. Порции в течение 1 ч при 0° С инкубировали в 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  и  $10^{-8}$  М [ $^3\text{H}$ ]-эстрадиоле и затем в течение 1 ч перемешивали с гепарин-агарозой. В конце каждого цикла сорбент промывали на бюхнеровской воронке 600 мл буферного раствора Б в 0,1 М КСl, а затем вновь уравновешивали буферным раствором А без КСl. По окончании инкубации и промывания, когда 75% комплекса эстрадиол — рецептор, изначально присутствовавших в цитозоле, было связано с 30 г гепарин-агарозы, гель использовали для набивки колонки К 16/50 Pharmacia. Фракционирование цитозоля на три порции позволило использовать минимальное количество гепарин-агарозы, что позволяет достичь малых объемов элюции и малого загрязнения образцов примесями, неспецифически сорбированными на агарозе. В течение первого и двух следующих циклов понижения адсорбирующей способности геля не отмечалось. Колонку с гепарин-агарозой промывали 0,18 М КСl в буферном растворе А, после чего элюировали раствором гепарина в буфере А при концентрации гепарина 3 мг/мл. Выход и степень очистки показаны в табл. 15. На градиенте сахарозы в буферных растворах А и Б

Рис. 42. Хроматография на сефадексе G-200 элюата с ДЭАЭ-целлюлозы.

Концентрированный до объема 3 мл элюат после ДЭАЭ-целлюлозы наносили на колонку с сефадексом G-200 общего объема 203 мл, уравновешенную буфером Б, и собирали фракции объемом 2 мл при скорости потока 12 мл/ч. В качестве стандартов использовались следующие белки: 1 — иммуноглобулин G человека, 2 — димер альбумина из плазмы быка, 3 — трансферрин человека, 4 — альбумин из плазмы быка, 5 — миоглобин.



комплексе эстрадиол — рецептор седиментирует при 6S, тогда как в буфере А или Б и в 0,4 М КСl седиментация происходит только при 4S.

Фракции, элюированные с генарин-агарозы, наносили на колонку К 50/50 Pharmacia с сефадексом G-200 (общий объем 962 мл), уравновешенную буферным раствором Б в 0,06 М КСl. Большая часть соединений, поглощающих при 280 нм, элюируется в свободном объеме колонки, тогда как комплекс эстрадиол — рецептор включается в гель и элюируется в объеме, соответствующем кажущейся молекулярной массе 250 000—300 000 дельтон. На градиенте сахарозы в буферном растворе А 70% комплекса эстрадиол — рецептор седиментируют при 6S, а 30% — при 4S, тогда как в буферном растворе Б несколько превалирует пик 4S, а в 0,4 М КСl единственный пик радиоактивности обнаруживается при 4S.

Соответствующие пикам фракции, полученные при элюировании образца с сефадекса G-200, сразу наносили на колонку объемом 50 мл с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную буферным раствором Б в 0,06 М КСl. Комплекс эстрадиол — рецептор элюировали линейным градиентом КСl в интервале 0,06—0,3 М. На градиенте сахарозы 4S-пик составляет около 60% общей радиоактивности в буферном растворе А, почти 90% — в буферном растворе Б и всегда 100% в 0,4 М КСl.

Фракции элюата с ДЭАЭ-целлюлозы после концентрирования при пониженном давлении анализировали на колонке с сефадексом G-200, уравновешенной буферным раствором Б. Рецептор элюируется в виде двух пиков I и II, причем кажущаяся молекулярная масса пика I вдвое больше, чем пика II (рис. 42). В табл. 15 указан только выход, а не степень очистки, поскольку абсорбция слишком мала, чтобы быть точно измеренной, поэтому



Рис. 43. Единичная полоса, которую дает рецептор эстрадиола в 10% акриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Фракции пика II второй хроматографии на сефадексе G-200 концентрировали до объема 6 мл и 60 мкл концентрата разводили в соотношении 1:1 20 мМ фосфатным буфером pH 7,0 2% β-меркаптобаццию вели 2 ч при 37 °С. Номера на правой части рисунка показывают подвижность: 1 — фосфоорила из плазмы быка, 2 — трансферрина человека, 3 — альбумина из плазмы быка, 4 — каталазы, 5 — овальбумина, 6 — альдолазы, 7 — рибонуклеазы.

определение белка потребовало бы слишком большого количества его раствора. Пики I и II были сконцентрированы и хроматографированы на той же колонке с сефадексом G-200. Пик I имеет тенденцию к диссоциации на молекулы такого же размера, как в пике II, тогда как пик II элюируется в том же объеме, что и при первой хроматографии на сефадексе G-200. Значения радиуса Стокса, полученные для пиков I и II, составляют 4,65 и 3,65 нм соответственно.

### Свойства очищенного рецептора

При гель-электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии ДДС пик II, полученный после второй гель-фильтрации, дает одну полосу, соответствующую молекулярной массе 69 000 даль-

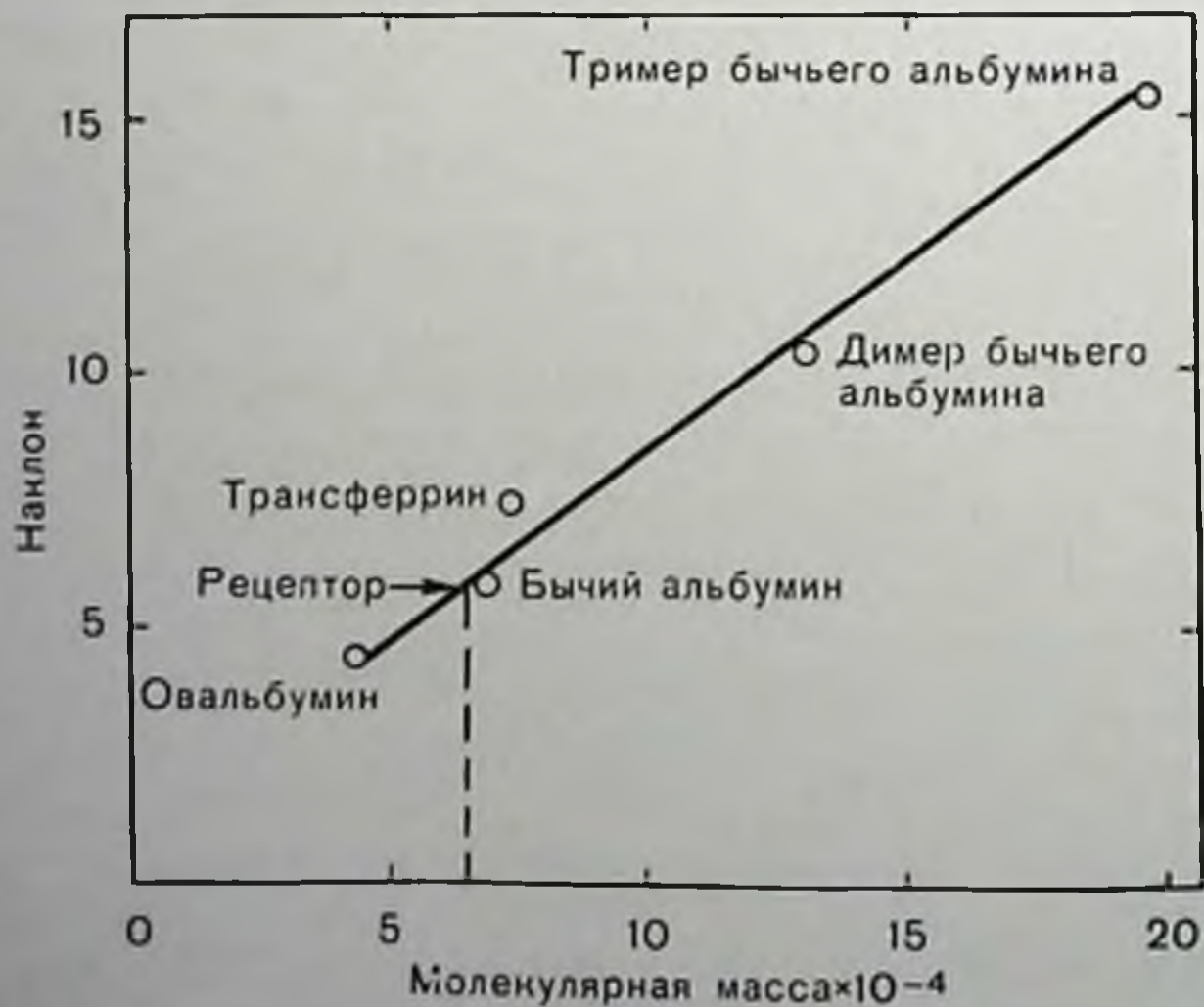


Рис. 44. Определение молекулярной массы комплекса эстрадиол—рецептор методом диск-гель-электрофореза в недиссоциирующих условиях. Очищенный комплекс (50 мкл) подвергали электрофорезу в 5, 6, 7, 8 и 9% акриламидных гелях [8].



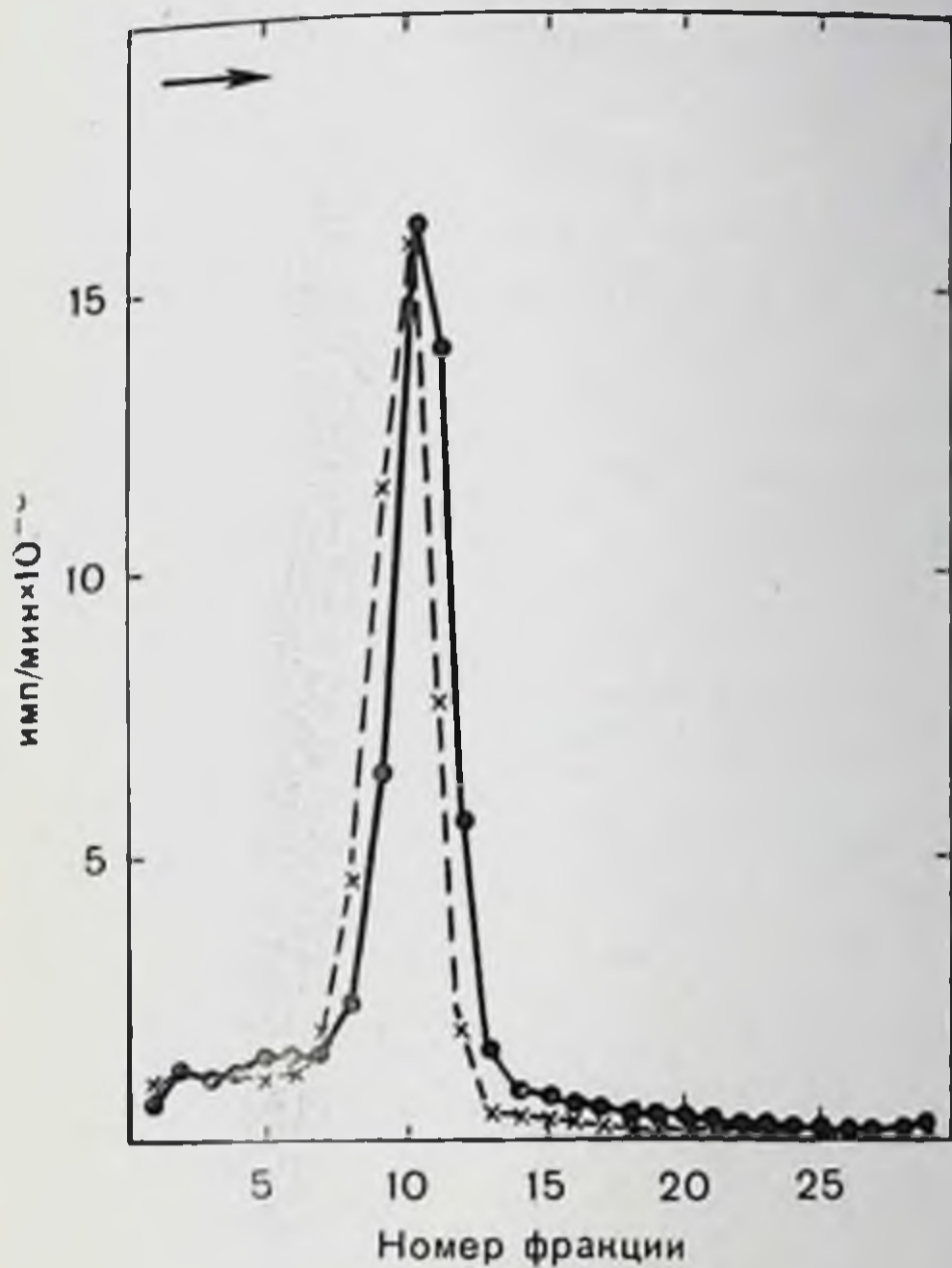


Рис. 45. Анализ чистого комплекса эстрадиол — рецептор в градиенте плотности сахарозы.

Очищенный комплекс (0,2 мл) наслаивали на 10—30% градиент сахарозы в буфере А (черные кружки) или в буфере А, 0,4 М КСl (крестики). Центрифугирование проводили в течение 11 ч при 2 °С и при 55 000 об/мин на роторе SW 10 Ti в ультрацентрифуге L5-75 Beckman.

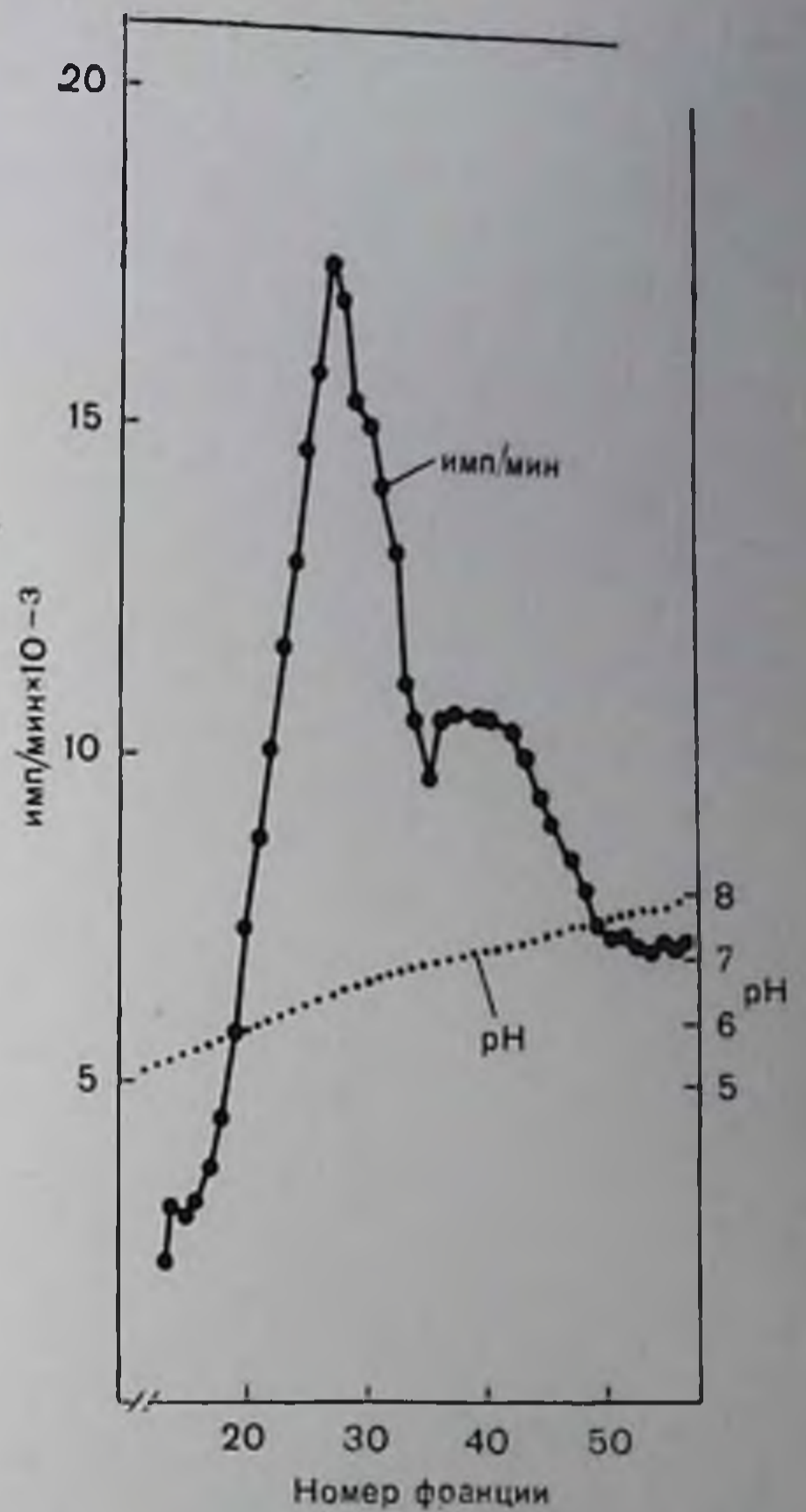


Рис. 46. Изоэлектрическое фракционирование очищенного комплекса эстрадиол — рецептор.

Градиент сахарозы (5—50%), содержащей 1% амфолинов рН 5,0—8,0, был префокусирован до понижения проводимости до постоянного значения 1,3 мА при 800 В и 7 °С. Образец (2 мл), полученный после второй хроматографии на сефадексе G-200, помещали на участок градиента с нейтральным рН [15]. Фракции по 2 мл собирали при 1,2 мА, 1000 В и 2 °С.

тон (рис. 43). В недиссоциирующих условиях анализ относительных подвижностей комплекса эстрадиол — рецептор и стандартных белков известной молекулярной массы, проведенный по методу Hedrick и Smith [8], дает значение кажущейся молекулярной массы 65 000 дальтон (рис. 44).

По данным анализа в градиенте плотности сахарозы очищенный препарат седиментирует при 4,3 S в присутствии или в отсутствие КСl (рис. 45). Из этого значения коэффициента седиментации (S) и из значения радиуса Стокса (a) по уравнению  $M = \frac{d(6\pi\eta N)S}{(1\bar{v}\rho)}$  может быть рассчитана молекулярная масса, оказавшаяся равной 67 000 дальтон при допущении, что величина парциального удельного объема ( $\bar{v}$ ) составляет 0,734. В уравнении  $\eta$  — вязкость, N — число Авогадро,  $\rho$  — плотность раствора.

Коэффициент трения ( $f/f_0$ ) по уравнению  $f/f_0 = a(3v\bar{M}/4\pi N)^{1/2}$  составляет 1,3.

Анализ очищенного материала методом электрофокусирования дает значение изоэлектрической точки 6,4, не отличающееся от определенного ранее для нативного, менее очищенного рецептора эстрадиола [15] (рис. 46).

Специфичность связывания стероидов, определенная по новому методу, изложенному в разделе «Методы», показывает, что связанный с рецептором гормон быстрее всего вытесняется эстрадиолом; за ним следуют эстрон и эстриол (табл. 16). Неэстрогенные

Т а б л и ц а 16. Остаточная эстрадиолсвязывающая активность очищенного рецептора после обмена с различными стероидами (в процентах к исходной)

Стероид	Концентрация, М				
	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$	$8 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$
Эстрадиол	58	38	25	0	0
Эстрон	78	54	25	11	0,6
Эстриол	96	77	42	15	5
Прогестерон					105
Тестостерон					96
Дигидротестостерон*					112

Примечание. Образец очищенного комплекса эстрадиол—рецептор объемом 0,2 мл вносили в 0,5 М NaSCN в присутствии  $3,6 \cdot 10^{-9}$  М [ $^3\text{H}$ ]-эстрадиола и указанной концентрации немеченого соответствующего стероида. Через 20 мин инкубации при комнатной температуре и 1 ч инкубации при 0° С образцы анализировали пропусканием через колонки с сефадексом G-25. Данные получены из двух экспериментов. Один — со стероидами в концентрации  $2 \cdot 10^{-7}$  М — имел в качестве контроля образец со специфически связанной активностью 124 000 dpm и без добавления немеченого стероида. Во втором эксперименте при всех остальных концентрациях трех эстрогенов в контрольном эксперименте специфически была связана активность 136 920 dpm.

\*  $\alpha$ -Дигидротестостерон (17 $\beta$ -окси-5 $\alpha$ -андростанон-3).

стероиды полностью неэффективны. Хотя перечисленные свойства и близки к установленным для сырого материала, чувствительность очищенного рецептора к осаждению изменяется. После добавления бычьего сывороточного альбумина и иммуноглобулина G в концентрации 1 мг/мл очищенный рецептор может быть осажден под действием 40 и 50% сульфата аммония (данные не показаны). Высокая тенденция нативного рецептора к агрегации, постоянно обнаруживаемая во всех стадиях очистки, менее выражена для чистого материала. Не представляется возможным определить, является ли это следствием потери в процессе очистки фактора агрегации или просто очень низкой концентрации конечного препарата.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя производная форма рецептора эстрадиола из матки теленка [20] или человека [5] может быть очищена методом аффинной хроматографии на эстрадиольных адсорбентах, склонность на-

тивного рецептора эстрадиола образовывать большие и необратимые агрегаты и сейчас препятствует всем попыткам его выделения. Специфическое и происходящее с высоким сродством взаимодействие между нативными рецепторами эстрадиола и гепарином дает хорошую основу для очистки этой формы рецептора. Если предположить, что полипептид с молекулярной массой 70 000 дальтон связывает одну молекулу эстрадиола, то теоретически чистый рецептор должен обладать удельной активностью  $1,3 \cdot 10^9$  dpm/mg (удельная активность [ $^3\text{H}$ ]-эстрадиола составляет 41 Ки/ммоль). Из использованного в наших экспериментах цитозоля рецептор должен быть очищен в 19 000 раз, а после стадии 4 (см. табл. 15) — еще в 17 раз. Такая степень очистки действительно достигается, как показывает наличие одной полосы при диск-гель-электрофорезе (см. рис. 43). После рехроматографии на сефадексе G-200 чистый рецептор диссоциирует на субъединицы молекулярной массы 70 000 дальтон, которые ранее обнаруживались в системе в виде олигомеров молекулярной массы 250 000—300 000 дальтон (в стадии 3).

Специфическое взаимодействие между нативным рецептором и гепарином может иметь и теоретическое значение. Факт, что ядерный и ФТР-трансформированный рецепторы теряют связывающий центр для гепарина, может отражать потерю гипотетического связывающего центра нативного рецептора для внеклеточных компонентов. Таким образом, ФТР этим путем может способствовать мобилизации рецептора из цитозоля в ядра, как это предполагалось ранее [16]. Вероятно, связывание гепарина с нативным рецептором отражает некую неизвестную специальную функцию, на которую указывают высокое сродство и специфичность этого связывания. Среди внутриклеточных белков, которые взаимодействуют с гепарином, определенной аналогией с нативным рецептором эстрадиола обладают факторы иницирования синтеза белка [24]. Наличие определенной взаимосвязи между этими соединениями может предполагаться на основании прямого действия стероидного рецептора на иницирование синтеза белка [11], взаимодействия и рецепторов эстрадиола и факторов инициации с частицами рибонуклеопротеинов, в частности с рибосомальной субъединицей с коэффициентом седиментации 40S [10], способности и рецепторов эстрадиола и факторов инициации диссоциировать с 40S-рибосомальной субъединицы под действием высокой концентрации соли [22] и гепарина (см. рис. 41), а также тенденции нативных рецепторов и факторов инициации выступать в виде комплексных агрегатов [2, 18, 24]. Нативный цитозольный рецептор может обладать регуляторной функцией в отношении синтеза белка во внеклеточном компартменте, но после связывания гормона рецептор может быть модифицирован под действием ФТР, приобретая в результате способность к свободной миграции в ядро, где он может активировать или регулировать специфические гены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ayuso-Parilla M., Henshaw E. C., Hirsch A. C.* The ribosome cycle in mammalian protein synthesis. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 4386—4393.
2. *Benne R., Hershey J. W. B.* Purification and characterization of initiation factor IF-F<sub>3</sub> from rabbit reticulocytes. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 3005—3009.
3. *Bitter T., Muir H. M.* A modified uronic acid carbazole reaction. — *Anal. Biochem.*, 1962, 4, 330—334.
4. *Chrambach A., Reisfield R. A., Wychoff M., Zaccari J.* A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. — *Anal. Biochem.*, 1967, 20, 150—154.
5. *Coffer A. I., Milton P. J. D., Davies J. P., King R. J. B.* Purification of oestradiol receptor from human uterus by affinity chromatography. — *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1977, 6, 231—246.
6. *Cuatrecasas P.* Protein purification by affinity chromatography. — *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 3059—3065.
7. *Gabriel O.* Analytical disc gel electrophoresis. — *Methods Enzymol.*, 1971, 22, 565—578.
8. *Hedrick J. C., Smith A. J.* Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1968, 126, 155—164.
9. *Jensen E. V., Suzuki T., Kawashima W., Stumpf P., Jungbult P. W., De Sombre E. R.* A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, 59, 632—638.
10. *Liang T., Liao S.* Association of the uterine 17- $\beta$ -estradiolreceptor complex with ribonucleoprotein in vitro and in vivo. — *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 4671—4678.
11. *Liang T., Liao S.* A very rapid effect of androgen on initiation of protein synthesis in prostate. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 706—709.
12. *Miller L. K., Diaz S. C., Sherman M. R.* Steroid-receptor quantitation and characterization by electrophoresis in highly cross-linked polyacrylamide gels. *Biochemistry*, 1975, 14, 4433—4443.
13. *Ohno S.* Simplicity of mammalian regulatory systems inferred by single gene determination of sex phenotypes. — *Nature*, 1971, 234, 134—137.
14. *Puca G. A., Bresciani F.* Receptor molecule for estrogen from rat uterus. — *Nature*, 1968, 218, 967—969.
15. *Puca G. A., Nola E., Sica V., Bresciani F.* Estrogen-binding proteins of calf uterus. Partial purification and preliminary characterization of two cytoplasmic proteins. — *Biochemistry*, 1971, 10, 3769—3779.
16. *Puca G. A., Nola E., Sica V., Bresciani F.* Estrogen binding proteins of calf uterus. — *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 1358—1366.
17. *Ross E., Schatz G.* Assay of protein in the presence of high concentrations of sulphhydryl compounds. — *Anal. Biochem.*, 1973, 54, 304—306.
18. *Safer B., Adams S. L., Kemper M. W., Berry K. W., Lloyd M., Merrick W. C.* Purification and characterization of two initiation factors required for maximal activity of a highly fractionated globin in RNA translation system. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 2584—2588.
19. *Schimke R. T., Stanley G., Shapiro D. J., Sullivan D., Palacios R.* Hormonal regulation of ovalbumin synthesis in the chick oviduct. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1975, 31, 175—211.
20. *Sica V., Parikh I., Nola E., Puca G. A., Cuatrecasas P.* Affinity chromatography and the purification of estrogen receptors. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 6543—6558.
21. *Stancel G. M., Leung M. T., Gorski J.* Estrogen receptor in the rat uterus. Multiple forms produced by concentration dependent aggregation. — *Biochemistry*, 1973, 12, 2130—2136.
22. *Sundkvist I. C., Staehlin T.* Structure and function of free 40 S ribosome subunits: Characterization of initiation factors. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 99, 401—418.
23. *Tomkins G. M., Martin D. W., Stellwagen R. H., Baxter J. D., Mamont P.,*

- Levison B. B.* Regulation of specific protein synthesis in eucaryotic cells. — Symp. Quant. Biol., 1970, 35, 635—640.
24. *Waldman A. A., Marx G., Goldstein J.* Isolation of rabbit reticulocyte initiation factors by means of heparin bound to Sepharose. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 2352—2356.
25. *Weber K., Osborne M.* The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. — J. Biol. Chem., 1969, 244, 4406—4412.
26. *Whelley S. M., Barker K. L.* Early effect of estradiol on the peptide elongation rate by uterine ribosomes. — Biochemistry, 1974, 13, 341—346.

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ ГОНАДОТРОПИНА В КЛЕТКАХ-МИШЕНЯХ ЯИЧНИКОВ С ПОМОЩЬЮ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

ПЕТЕР ПЕТРУЦ, МАДХАБАНАНДА САР, УОЛТЕР Е. ШТУМПС  
(PETER PETRUSZ, MADHABANANDA SAR, WALTER E. STUMPF)

*Отдел анатомии и лаборатория биологии развития, Университет  
Северной Каролины, Чапел Хилл, Северная Каролина 27514, США*

### ВВЕДЕНИЕ

Гонадотропинам, как и другим белковым гормонам, для проявления своей биологической активности требуется присутствие на поверхности их клеток-мишеней специфических связывающих или рецепторных центров (в этом разделе термин «белковый гормон» будет употребляться для обозначения всех гормонов, представляющих собой белки, гликопротеины и пептидные гормоны). Общепринятая теория гормонального действия через так называемый второй мессенджер [99] утверждает, что связывание гормонов с такими поверхностными рецепторами активирует цепь внутриклеточных метаболических актов, которые, если уж они начались, более или менее автоматически ведут к биологическому выражению реакции клеток на действие гормона. Первоначально теория второго мессенджера не рассматривала дальнейшую судьбу гормона после его связывания с рецептором, но подразумевалось (или по крайней мере впоследствии это стало подразумеваться само собой), что гормон, интактный или инактивированный, каким-то образом диссоциирует с поверхностного рецептора и вновь высвобождается за пределы клеточных компартментов. Однако эта часть теории не была подтверждена для большинства гормонов и вряд ли представляет собой действительно некий общий механизм. Другая альтернатива, захват и внутриклеточное превращение комплекса гормон — рецептор, в значительной мере вообще не принималась в расчет из-за ложного положения, что макромолекулы такого размера, какой имеет большинство белковых гормонов, неспособны проникать через мембрану живой клетки. Справедливо это положение или нет — не имеет значения, поскольку речь идет о проникновении гормона в клетку-мишень. Макромолекулы как таковые не проникают в живые клетки через плазматические мембраны (хотя известно несколько исключений,

как правило, губельных для клетки) [61, 73, 76]; с другой стороны, клетки обладают общими и хорошо известными механизмами везикулярного захвата (фагоцитоз, пиноцитоз, эндоцитоз) и последующего метаболизма различных экзогенных макромолекул, например антигенов, вирусов, нуклеиновых кислот, лектинов, гистонов, различных утилизируемых белков [54, 73, 86, 102, 103, 105] и даже, как мы увидим далее, белковых гормонов. Эти механизмы известны уже более 20 лет и неоднократно рассматривались в различных обзорах [9, 10, 12, 15, 51, 74, 75].

В настоящем разделе мы приводим данные в пользу возможных взаимодействий между белковыми гормонами и их клетками-мишенями на этапах, следующих за начальным связыванием с поверхностью. Многие из этих аргументов базируются на полученных как в нашей, так и в других лабораториях свидетельствах о внутриклеточной локализации гонадотропинов и других белковых гормонов. И, наконец, мы предлагаем простую модель, основанную на гипотезе, позволяющей дать разумное объяснение многочисленным экспериментальным данным, которые не согласуются с общепринятыми концепциями относительно механизма действия белковых гормонов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гипофизарные гонадотропины — фолликулестимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) — представляют собой гликопротеины с молекулярной массой около 32 000 дальтон. Оба они состоят из двух неидентичных субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$ . Биологическая специфичность гормона определяется  $\beta$ -субъединицей, тогда как функции  $\alpha$ -субъединиц еще неясны. Общей  $\alpha$ -субъединицей обладают ФСГ, ЛГ, тиростимулирующий гормон (ТСГ) и плацентарный хорионный гонадотропин человека (ПХГЧ) [2, 78]. В большинстве иммуноцитохимических экспериментов в нашей лаборатории использовалось наличие иммунологической кросс-реактивности между ПХГЧ и гонадотропинами крыс [57, 66, 81]. В настоящей работе мы не предпринимали попыток разграничить гонадотропины крыс — ФСГ и ЛГ. Третий гипофизарный гормон, часто принимаемый за гонадотропин — пролактин (ПЛ), представляет собой белок с молекулярной массой около 24 000 дальтон и химически подобен гормону роста и плацентарному лактогену.

Места связывания гормонов могут быть определены или иммуноцитохимически или методом авторадиографии. Следует заметить, что оба метода позволяют исследователю регистрировать только метку без всякой гарантии, что в момент наблюдения она принадлежит интактной молекуле гормона. Даже малый фрагмент гормональной молекулы, если только он несет радиоактивную метку в случае авторадиографии либо иммунореактивную метку или антигенную детерминанту в случае иммуноцитохимического метода, будет регистрироваться соответствующим методом как сигнал обнаружения гормона.

Используемая нами в настоящее время техника иммуноцитохимических исследований, метод иммуноглобулин-ферментного мостика [60], детально описана [79, 81]. Специфичность иммунного окрашивания оценивалась по общепринятым критериям [82] и к ней относятся все высказанные выше замечания.

Для автордиографии использовали высокоочищенные для йодирования гормоны крыс. Мечение  $^{125}\text{I}$  (Amersham — Searle) проводили по описанному ранее методу [81]. Введение меченого гормона и обработку тканей производили известными методами [87, 88]. Йодсвязывающие центры в ткани блокировали предварительной обработкой ткани нерадиоактивным KI. Специфичность автордиографической локализации подтверждали наличием конкуренции с избытком немеченого гормона, различными картинами локализации для использованных гормонов (ФСГ, ПХГЧ, ПЛ) и отсутствием картины специфической локализации при использовании меченого  $^{125}\text{I}$  крысиного альбумина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Наши первые иммуногистохимические попытки локализовать места связывания гонадотропинов относятся к 1973 г. [83]. В этих экспериментах использовали метод местной обработки ПХГЧ, фиксированных формальдегидом и залитых парафином яичников

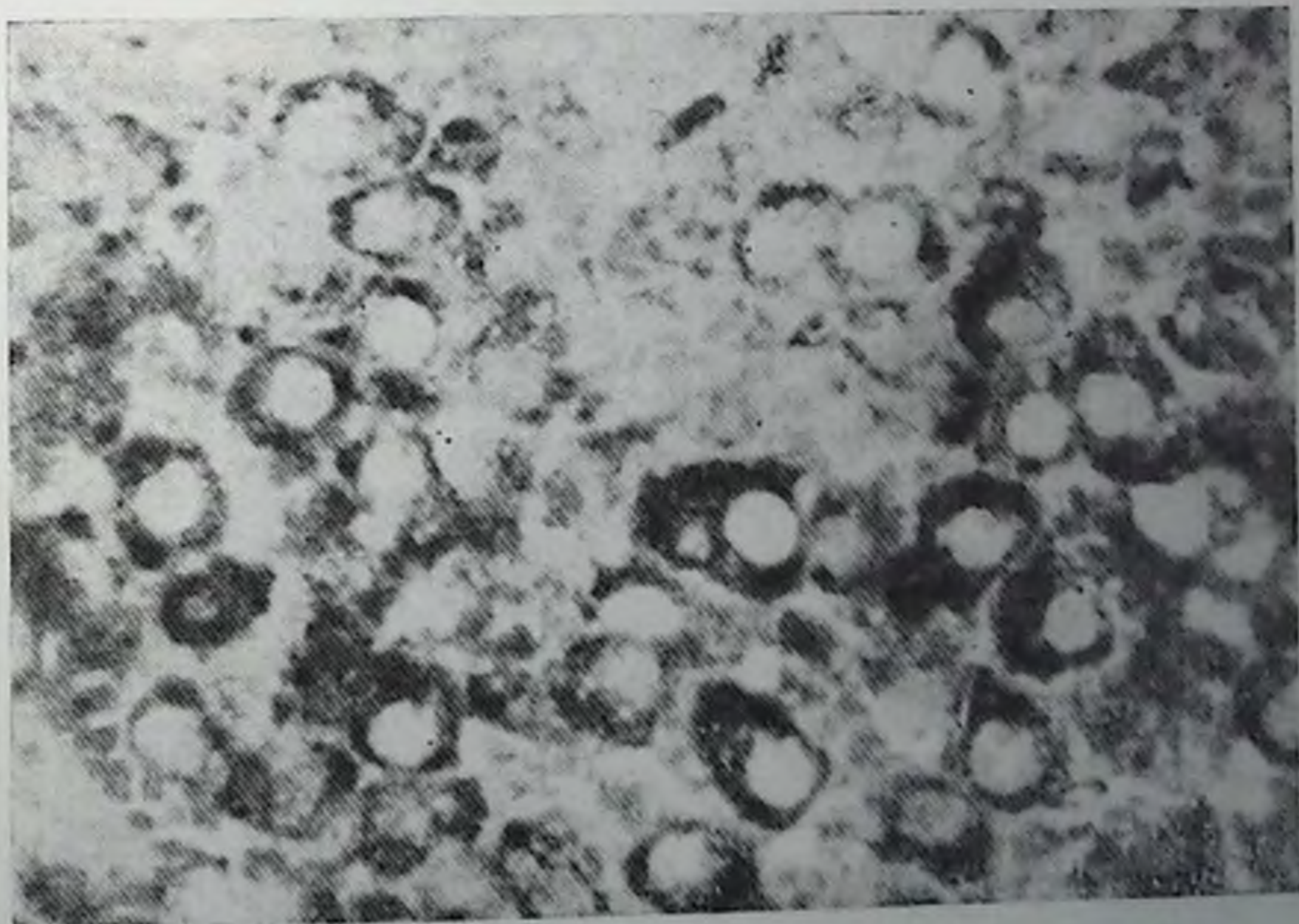


Рис. 47. Локализация связывающих центров для гонадотропина в желтом теле яичников крыс. Срезы инкубировали с ПХГЧ, а затем обрабатывали анти-ПХГЧ и конъюгатом иммуноглобулина с ферментом. Темный реакционный продукт в цитоплазме клеток желтого тела представляет связанный ПХГЧ. Ув. 400.

крыс. В везикулярных и гранулярных структурах цитоплазмы интерстициальных клеток и клеток желтого тела яичников удавалось в результате наблюдать специфическую локализацию гормона (рис. 47). Свидетельств предпочтительного связывания гормона с поверхностью клеток-мишеней обнаружено не было. Это было расценено как неточность метода и как общее ограничение, свойственное местному применению гормона на срезах, делающих доступными внутренность клеток. Этот подход с тех пор показал свою применимость и полезность для экспериментов с зафиксированными или замороженными тканями и был использован для иммуноцитохимической локализации рецепторов ЛКТГ [93] и ЛГ-высвобождающего фактора [94], а также для автордиографического изучения взаимодействия гормонов с клетками-мишенями в тканях яичников и семенников крыс [28, 29, 34, 65, 85]. Результаты перечисленных работ, подобно нашим результатам, не подтверждают, что белковые гормоны связываются только с поверхностными рецепторами своих клеток-мишеней.

Местное применение гормонов использовалось также при изучении онтогенеза связывающих центров гонадотропинов у половозрелых крыс [79, 80]. Было обнаружено, что места связывания гонадотропинов появляются в яичниках половозрелых крыс намного раньше, чем предполагалось ранее, и что их появление согласуется с гормональными явлениями в системе гипофиз — яичники, приводящими к половозрелости [79, 80]. Внутриклеточное распределение связывающих центров в значительной мере идентично описанному ранее [83]: представляется, что гонадотропины связываются с цитоплазматическими и в некоторых случаях с ядерными центрами (рис. 48). На основании этих наблюдений в 1974 г. было высказано предположение, что «возможность существования ядерных рецепторов гонадотропинов заслуживает изучения» [79].

Благодаря существенным усовершенствованиям методов иммуноцитохимических исследований, введенным в 1975 г. [81], мы смогли регистрировать гормоны, связанные с тканью яичников в условиях *in vivo*, без локального нанесения гормонов на гистологические срезы. Теперь срезы инкубировались только с антигонадотропиновой сывороткой, после чего для идентификации мест связывания антител использовали иммуноглобулин-ферментные комплексы. В типичном эксперименте взрослым крысам-самкам через 2 дня после гипофизэктомии вводили 1000 единиц ПХГЧ; контрольным животным вводили изотонический раствор хлорида натрия. Через 2 ч после инъекции крыс умерщвляли и места локализации гормона идентифицировали с помощью анти-ПХГЧ сыворотки № 16, полученной в нашей лаборатории и охарактеризованной ранее [81]. Гонадотропины удалось обнаружить в желтом теле яичников, в интерстициальных клетках, в некоторых развивающихся фолликулах, а также в стенке (преимущественно в гладкомышечных клетках) мелких артериол стромы яичников. Был отмечен полный набор возможных внутриклеточных



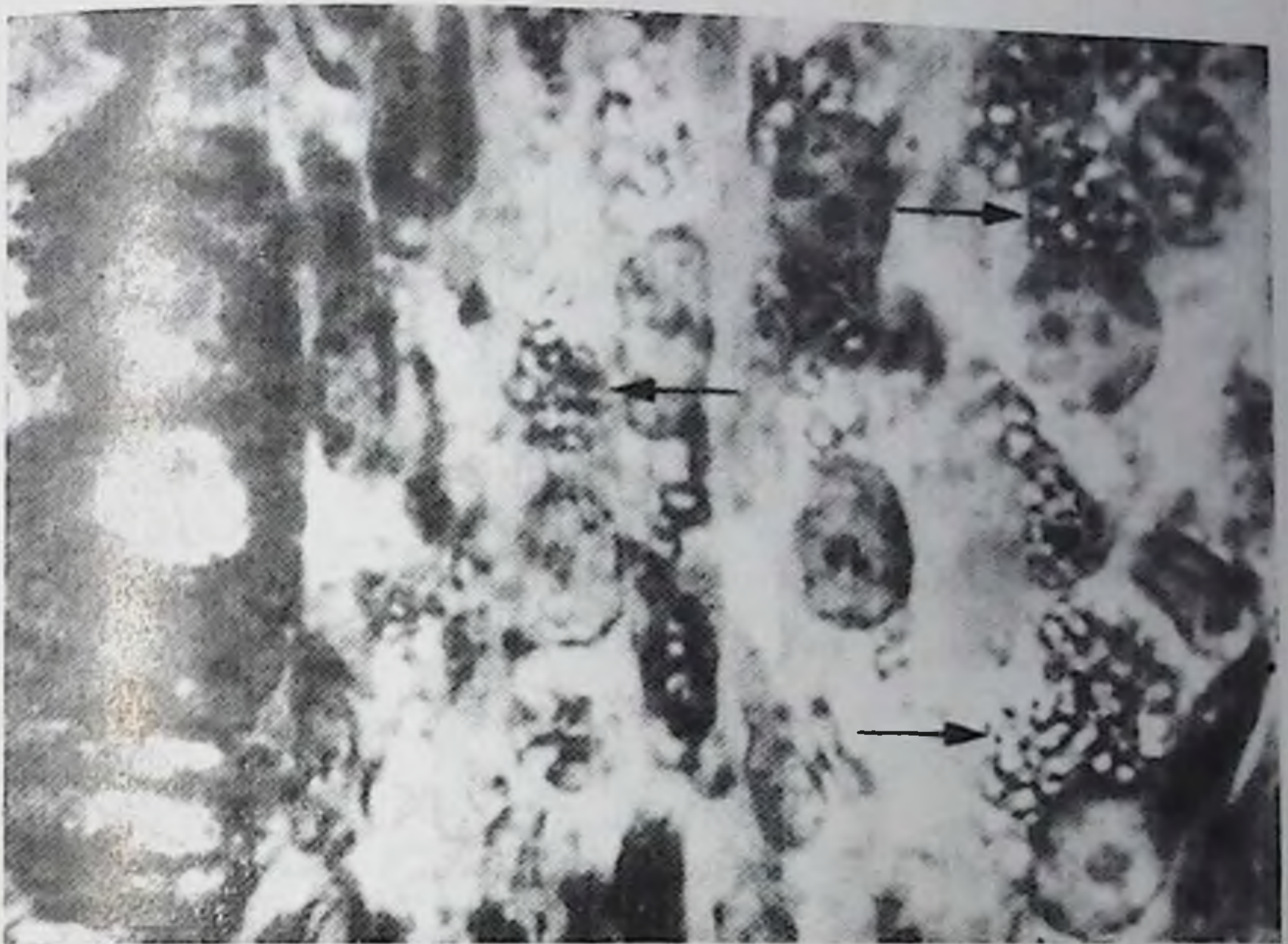


Рис. 48. Локализация связывающих центров для гонадотропина в зернистых клетках яичников (левая часть) и интерстициальных клетках (правая часть, отмечены стрелками) 17-дневной крысы. Иммунопероксидазную реакцию проводили, как и для случая, представленного на рис. 47. Ув. 1000.

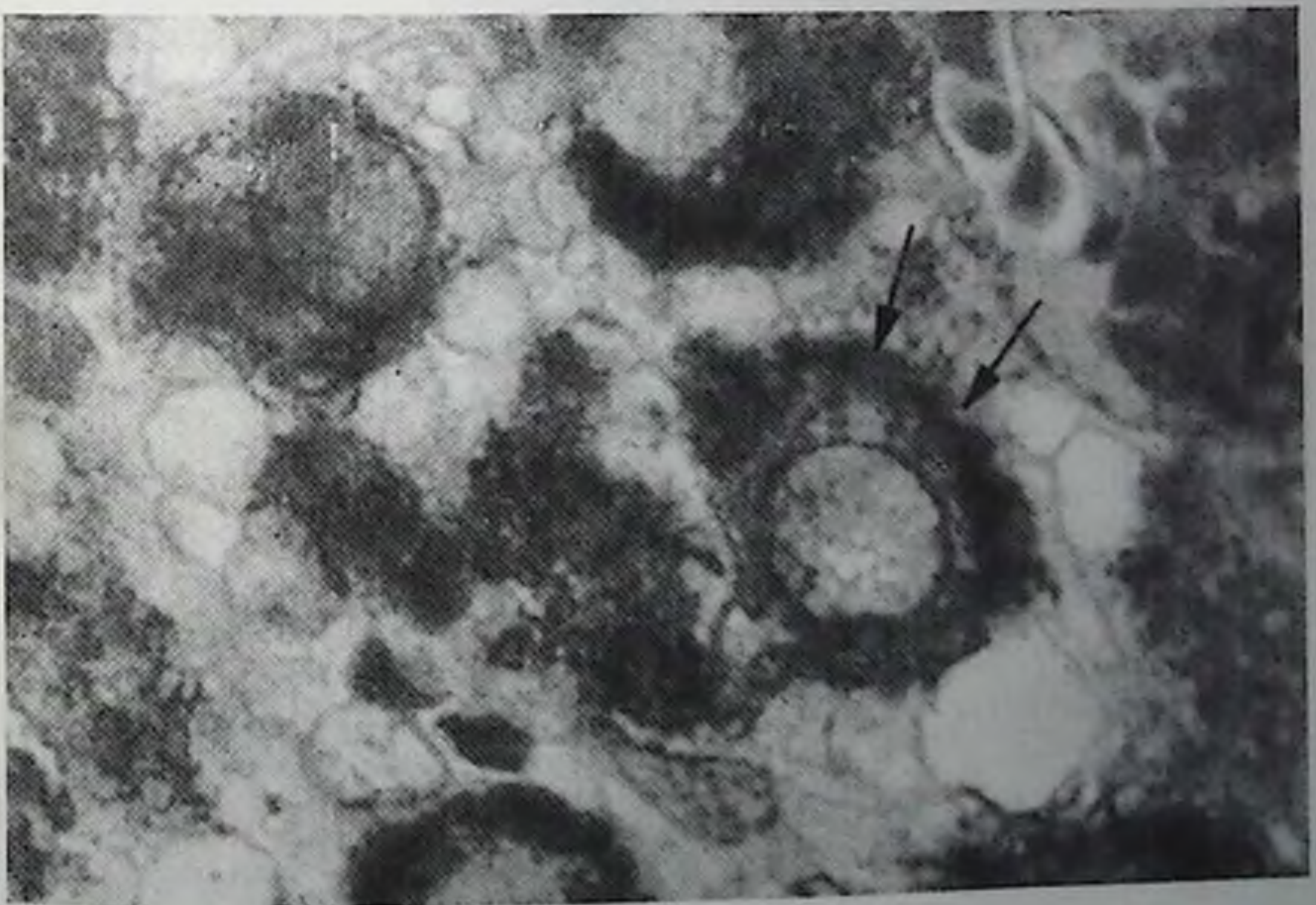


Рис. 49. Иммунопероксидазная локализация ПХГЧ, введенного взрослым крысам-самкам с удаленным гипофизом. Показана часть желтого тела яичников.

Стрелками отмечен ПХГЧ, локализованный на поверхности клеток желтого тела. Заметим, что в изображенной в верхней части снимка клетке локализация ПХГЧ, по-видимому, цитоплазматическая. Ув. 1000.

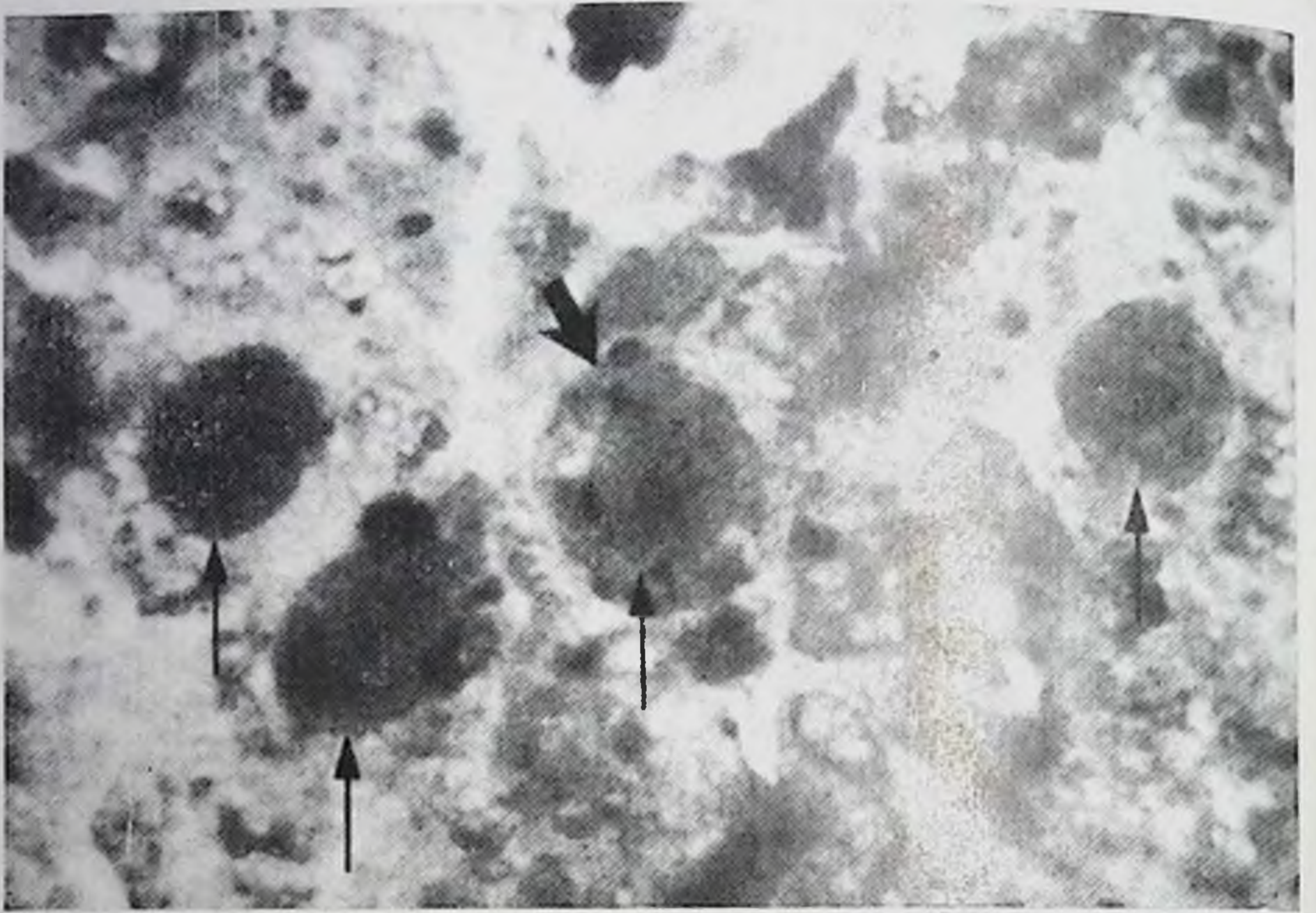


Рис. 50. Иммунопероксидазная локализация ПХГЧ, введенного взрослым крысам с ложной беременностью (объяснение в тексте).

Короткая жирная стрелка указывает клетку, где гормон локализован на обеих сторонах клеточной поверхности, в цитоплазме и в ядре. Длинными стрелками показаны клетки, в ядрах которых обнаруживается темное окрашивание, указывающее на присутствие иммунореактивного гонадотропина. Ув. 1000.

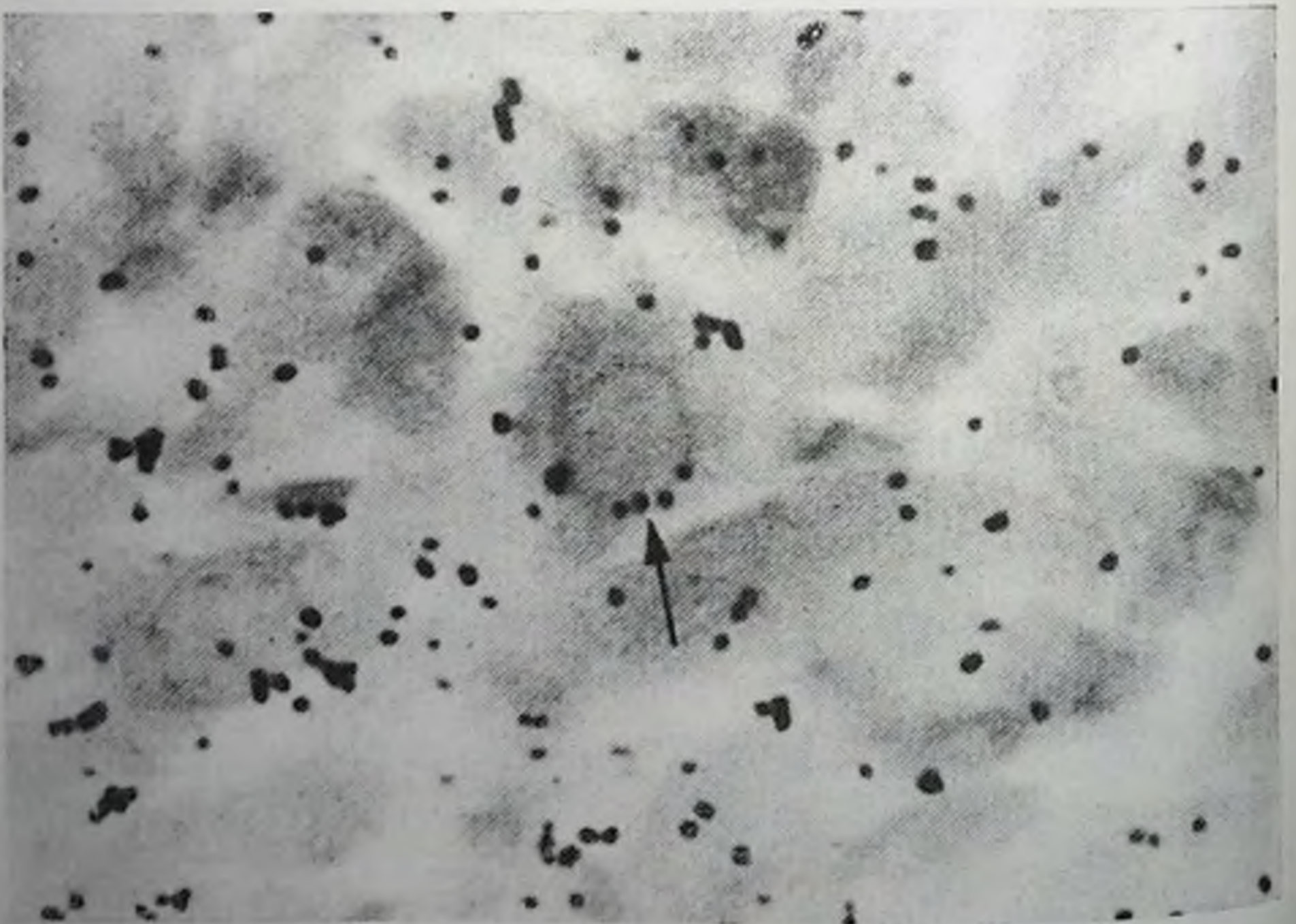


Рис. 51. Авторадиографическая локализация в желтом теле яичников крысы с ложной беременностью введенного  $^{125}\text{I}$ -пролактина.

Стрелкой отмечена околоядерная локализация гранул серебра в клетках желтого тела. В той же клетке отмечается дополнительная цитоплазматическая и, возмож-

локализаций гормона: в некоторых клетках гонадотропины были зарегистрированы на поверхности (рис. 49), в других — в цитоплазме, в третьих — в ядрах. Ядерная локализация была особенно выражена в зернистых клетках фолликулов среднего размера (вторичных) с начинающимся формированием полости. Аналогичный спектр внутриклеточной локализации гормона показан на рис. 50, полученном в результате другого эксперимента. В этом случае взрослых крыс-самок сначала подвергали действию гонадотропина сыворотки беременных кобыл, а затем действию ПХГЧ с целью индуцировать сильную лютеинизацию яичников [77]. Через 5 дней животным делали каждый час инъекции 100 единиц ПХГЧ в течение 10 ч и затем умерщвляли. Таким образом, яичники подвергались непрерывному воздействию высоких концентраций гормона в течение довольно долгого времени. В результате клетки желтого тела яичников обнаруживали полный набор поверхностных, цитоплазматических и ядерных локализаций ПХГЧ, причем в каждой клетке существовал различный набор этих основных центров связывания. При изучении множества клеток, подобного изображенному на рис. 50, может создаться впечатление, что в микроскопе удастся видеть некие статические изображения, отражающие различные прогрессирующие стадии единого процесса, включающего связывание гормона с поверхностью, захват его цитоплазмой, центростремительное движение и, наконец, локализацию гормона в ядре.

На рис. 51 показан типичный пример проведенных нами автордиографических исследований: некоторые из них были опубликованы в виде кратких статей [87, 88], а другие будут детально описаны в готовящихся публикациях. Автордиография, осуществляемая после введения меченых ФСГ, ПХГЧ или ПЛ, в значительной степени подтверждает наблюдения, сделанные с использованием иммуноцитохимического метода: эти результаты не могут быть интерпретированы в том плане, что какой-либо из перечисленных гормонов имеет исключительно поверхностную локализацию. Околоядерное расположение окрашенных гранул, как показано на рис. 51 для случая ПЛ, было наиболее явным и постоянным результатом автордиографических экспериментов со всеми тремя гормонами.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из представленных результатов, локализация гонадотропных гормонов, выявленная с помощью световой микроскопии с использованием иммуноцитохимических и автордиографических методов, не поддерживает в целом концепцию, что эти гормоны взаимодействуют с клетками-мишенями исключительно через рецепторы, расположенные на поверхности клетки. Исключительно поверхностное связывание гонадотропинов с клетками-мишенями яичников хотя в некоторых случаях и наблюдалось, но представляло собой скорее исключение, а не правило. В боль-

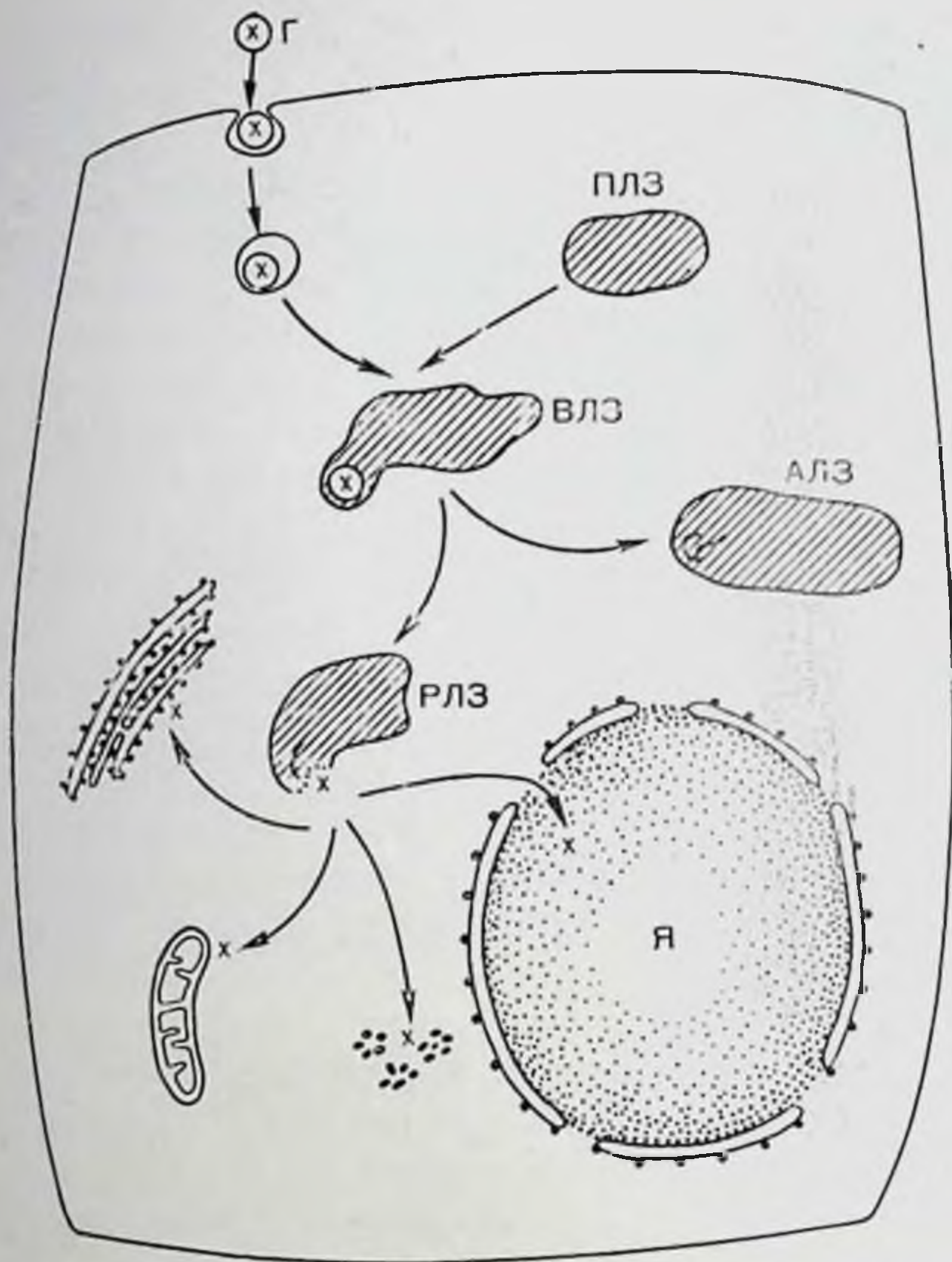


Рис. 52. Предлагаемая модель превращения гормона в клетках-мишенях. Г — гормон; х — фрагмент гормона, способный взаимодействовать с внутриклеточными мишенями; ПЛЗ — первичные лизосомы; ВЛЗ — вторичные лизосомы; РЛЗ — регуляторные лизосомы; АЛЗ — автофагоцитирующие лизосомы; Я — ядра. Объяснение в тексте.

В большинстве клеток-мишеней гормоны обнаруживались в цитоплазме, во многих случаях — в околядерной зоне, в некоторых случаях — в ядре. Очевидно, что любые попытки объяснить эти результаты должны начинаться с признания бесчисленных доказательств, накопленных в литературе, существования и биологического значения рецепторов клеточной поверхности для белковых гормонов и многих других веществ. С другой стороны, следует ожидать какого-то рационального объяснения, способного разрешить конфликт между современными воззрениями и возрастающим числом экспериментальных данных, указывающих на существование внутриклеточных мишеней для различных белковых гормонов.

Гипотеза о механизме взаимодействия гормона с клеткой-мишенью, возникшая на основе приведенных соображений, представлена в виде простой модели на рис. 52. Согласно этой модели белковый гормон (Г), связанный с поверхностным рецептором клетки-мишени, входит внутрь клетки посредством эндоцитоза — процесса, включающего движения мембраны, инвагинацию и,

наконец, образование мелких везикул в цитоплазме. Эти везикулы, содержащие все еще интактный гормон, связанный с рецептором, сливаются, по-видимому, первоначально друг с другом, а затем с первичными лизосомами (ПЛЗ). Вторичные лизосомы (ВЛЗ), образующиеся в результате этого слияния, содержат внутри мембраны гормон, рецептор и ферменты родительских первичных лизосом. В такой системе гормон может претерпевать инактивацию и частичную деградацию (то же, по-видимому, относится и к рецептору) в автофагоцитирующей лизосоме (АЛЗ). С другой стороны, гормон может претерпевать только частичную деградацию в функционально модифицированной лизосоме, названной регулярной (РЛЗ). Затем гормон или его биологически активный фрагмент (например,  $\beta$ -субъединица или ее часть) высвобождается из лизосомы и может теперь взаимодействовать с различными компонентами цитоплазмы или с ядром.

Эта модель, поскольку она касается гонадотропинов, носит в значительной мере гипотетический характер. Существуют, однако, два момента, которые позволяют принять ее в качестве рабочей гипотезы и подвергнуть серьезной проверке. Во-первых, она дает рациональное объяснение ряду фактов, которые кажутся взаимно противоречивыми или необъяснимыми; во-вторых, каждая из стадий гипотетической модели сама по себе базируется на хорошо известных и экспериментально подтвержденных положениях клеточной биологии. Эти положения и поддерживающие их экспериментальные доказательства будут далее последовательно рассмотрены применительно к предложенному механизму утилизации гормона в клетке-мишени.

Важно заметить в самом начале, что предложенная модель совместима с современными взглядами на механизм действия белковых гормонов в том плане, что она не отрицает, а скорее требует существования специфических рецепторов на поверхности клеток-мишеней. Без присутствия специфических поверхностных рецепторов процесс не сможет быть достаточно селективным или чувствительным или даже вообще может не иметь места. Поскольку существование таких рецепторов для большинства белковых гормонов точно установлено, достаточно будет указать несколько обзоров, суммирующих современные знания по этому вопросу [23, 52, 53].

Везикулярный захват макромолекул, связанных с поверхностными рецепторами, также хорошо изучен [9, 10, 15, 51, 54, 74, 75, 96]. Этот процесс, называемый эндоцитозом, представляет собой почти универсальный механизм, связанный с появлением внутриклеточных мембранных систем и органелл в клетках эукариотов [51] и широко проявляется при переработке и деградации в клетках таких экзогенных макромолекул, как антигены, вирусы, лектины, белки сыворотки и т. п. [17, 27, 73, 86, 96, 102, 103]. Гормоны, в том числе гонадотропины, захватываются своими клетками-мишенями и локализуются в цитоплазматических структурах, как было показано морфологически [1, 20—22, 24, 44—46, 59, 70,

71, 92, 94] и биохимически [5, 18, 26, 43, 48, 56, 84]. В исследованиях, проводимых в нашей лаборатории, показано, что ФСГ захватывается и концентрируется в цитоплазме мышечных клеток Сертоли в культуре.

Слияние эндоцитотических везикул с первичными лизосомами является обычным следствием везикулярного захвата. Доказательства того, что это действительно происходит во многих клетках и со многими поглощенными веществами, суммированы и детально рассмотрены [3, 31, 32, 72]. Лизосомы присутствуют в больших количествах почти во всех тканях [3, 32, 36, 72, 95], включая и репродуктивную систему [35]. Abel и соавт. [1, 24 и соответствующий раздел в этой книге] получили прямое подтверждение того, что гонадотропины действительно включаются в лизосомы клеток желтого тела яичников овец. Недавние исследования Nan и соавт. [46] обнаружили подобную локализацию в фолликулярных зернистых клетках яичников крыс. Биохимические эксперименты, проведенные Ascoli и Puett [5], позволили авторам сделать вывод, что ЛГ и ПХГЧ в семенниках также утилизируются лизосомами клеток-мишеней. Гормональная стимуляция фагоцитоза и лизосомальной активности под действием ФСГ и ПХГЧ (69, 25) была показана для семенников крыс, для АКГГ в клетках коры надпочечников [101], а также для ряда других систем гормон — клетка-мишень [6, 7, 8, 104]. По-видимому, наиболее известным примером является стимуляция под действием ТСГ захвата тироглобулина из коллоидной системы тиреоидными фолликулярными клетками с последующим слиянием пиноцитотических везикул с первичными лизосомами для дальнейшей утилизации [37, 106, 107]. Было также показано, что иммунные комплексы активируют лизосомы в макрофагах [19].

В дополнение к приведенным выше прямым доказательствам существует ряд косвенных, но достаточно важных подтверждений, того, что интернализация гормон-рецепторного комплекса может иметь и еще одну цель: регуляцию плотности рецепторов на поверхности клетки. Недавно проведены исследования, в которых в отношении ряда гормонов, в том числе и гонадотропинов, показано, что длительное действие гормона вызывает прогрессирующее понижение числа доступных рецепторов соответствующего гормона на поверхности клетки, причем этот процесс не может быть объяснен простым выключением существующих рецепторов в результате связывания гормона [33, 40, 49, 90, 109]. Хотя в это явление могут быть вовлечены и другие механизмы, помимо интернализации [13, 14, 68, 108], клеточный захват и последующая деградация остаются все же наиболее простым и вероятным объяснением.

Наиболее спорной частью модели, приведенный на рис. 52, является роль регуляторной лизосомы. Подобная лизосома в отличие от других, выполняющих только функции простого удаления соединений, должна подвергаться гормон определенному ферментативному воздействию и затем высвободить его или его активный

фермент в цитоплазму. Существует очень мало экспериментальных подтверждений того, что это действительно имеет место. Прерывистость лизосомальной мембраны, схематически показанная на рис. 52, не обсуждена в научной литературе подробно. Кроме того, беспорядочное высвобождение содержимого лизосомы в цитоплазму может быть так же опасно для клетки, как и повреждение ее плазматической мембраны под действием агрессивного агента [31, 76, 105]. Однако некоторые наблюдения помогают разрешить этот сложный вопрос по крайней мере в теоретическом аспекте. Во-первых, показано, что ряд химических соединений, включая различные гормоны [36, 100, 101], влияет на стабильность лизосомальных мембран. Лабильность мембраны может обеспечить избирательное, регулируемое высвобождение содержимого лизосомы без разрушения мембраны. Кроме того, лизосомы, участвующие в превращении белковых гормонов, могут не быть идентичны лизосомам, предназначенным для переработки экзогенных или эндогенных соединений, которые должны быть удалены из клетки. Общепринято полагать, что «биохимическая концепция лизосом, возможно, охватывает несколько биологически и морфологически разных структур...» [32, 72]. Существует прямое экспериментальное подтверждение [51] того, что слияние эндоцитотических везикул с первичными лизосомами представляет собой селективный процесс и в определенной степени зависит от содержимого этих везикул. Если это действительно так, открывается широкая возможность для участия экзогенных макромолекул в регулировании внутриклеточных процессов.

Существует несколько хорошо известных примеров, показывающих, как в действительности работают регуляторные лизосомы. Мы уже упоминали механизм, по которому тироглобулин претерпевает метаболизм в фолликулярных клетках щитовидной железы, что приводит к высвобождению тиронидных гормонов и представляет собой контролируемый ответ клеток на действие ТСГ [37, 89, 106, 107]. Аналогично этому липопротеины низкой плотности (ЛПНП) захватываются своими клетками-мишенями: в этом случае содержащиеся ЛПНП эндоцитотические везикулы сливаются с лизосомами, где соответствующие ферменты превращают ЛПНП с высвобождением в цитоплазму свободного холестерина. Количество холестерина регулирует не только метаболизм клеточных стероидов, но также и синтез новых рецепторов для ЛПНП и, таким образом, способность клеток утилизировать дополнительные количества ЛПНП [17]. Дополнительные примеры регуляторной роли лизосом дает судьба различных вирусов в атакуемых ими клетках: обычно в первой стадии вирус связывается с клеточной мембраной, затем захватывается клеткой по механизму эндоцитоза, после чего содержащиеся вирус везикулы сливаются с лизосомами, где вирус освобождается от своей белковой оболочки; остающиеся пучки РНК или ДНК выходят из лизосомы в свободном виде взаимодействуют с компонентами цитоплазмы или ядра [27, 91]. Наличие подобных механизмов неоднократно

демонстрировалось в связи с встраиванием экзогенной ДНК в геномы клеток млекопитающих [47, 55]. Хотя такие ситуации могут быть достаточно редкими, они имеют огромное значение в фармакологии и в генной инженерии [38, 51]. Все сказанное позволяет считать, что клетки-мишени для белковых гормонов также могут утилизировать молекулы гормонов способом, позволяющим биологически важным фрагментам гормона освободиться из лизосом и, таким образом, делающим их способными взаимодействовать с другими органеллами цитоплазмы или с ядрами [95, 100, 101].

И, наконец, важнейшим основанием для допущения того факта, что белковые гормоны утилизируются в лизосомах и способны высвободиться из них, является неоднократное обнаружение этих гормонов (или наличия их взаимодействия) в различных внутриклеточных компонентах, которых они не могут достичь никаким иным способом, кроме предложенного, если только не допустить их действие непосредственно через клеточную мембрану, что представляется гораздо менее вероятным. В дополнение к нашим собственным экспериментам можно указать на сообщения о ядерной локализации ТСГ в фолликулярных клетках щитовидной железы [45] и инсулина в различных тканях [4, 42, 43, 56], митохондриальной локализации паратиреоидного гормона в эпителии почечных канальцев [71], цитоплазматической и ядерной локализации гонадотропинов в семенниках [21, 22, 50, 59] и ядерной локализации меченного йодом ПХГЧ в яичниках крыс [46]. Сообщалось также, что в биохимических препаратах гонадотропины [13, 26, 30], инсулин [11, 18, 39, 41—43, 48, 92], ТСГ [68], фактор роста эпидермиса [20], ангиотензин [58] и тиротропинвысвобождающий фактор [44] связываются с клеточными фракциями, отличными от фракции плазматических мембран. Рецепторы или связывающие молекулы для некоторых белковых гормонов обнаружены в цитозольных фракциях тканей-мишеней [13, 18, 39, 58, 68, 108]. Было показано, что ПХГЧ специфически взаимодействует с цитозолем и ядерными фракциями желтого тела крыс [62—64, 84], а также с митохондриями из ткани семенников [97, 98]. Функциональные рецепторы ФСГ и ЛГ в семенниках крыс могут быть выявлены простой гомогенизацией [16]. Имеются определенные указания на то, что гонадотропины и другие белковые гормоны локализуются и взаимодействуют с такими внутриклеточными центрами, которые традиционно считались невосприимчивыми к действию экзогенных макромолекул. Гипотеза, представленная в настоящем разделе, является попыткой предложить разумное объяснение того, как и почему такие взаимодействия могут иметь место. Эта модель прочно связана с установленными положениями клеточной биологии, однако требует тщательной проверки для каждой из предложенных стадий. Эксперименты, предпринятые с этой целью, должны дать решение многих вопросов, которые в настоящее время не могут быть решены только на основе теории второго мессенджера.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abel J. H., Jr., McClellan M. C., Chen T., Sawyer H. R., Niswender G. D.* Subcellular compartmentalization of ovarian granulosa-luteal cell functions. — *J. Cell Biol.*, 1976, 70, 367a.
2. *Acher R.* Molecular evolution of the polypeptide hormones. — In: *Polypeptide Hormones: Molecular and Cellular Aspects*, ed. by R. Porter, D. W. Fitzsimmons, 1976, p. 31—55. Elsevier, Amsterdam.
3. *Allison A. C.* Lysosomes. In: *The Biological Basis of Medicine*, ed. by E. E. Bittar, N. Bitar, 1968, p. 209—242. Academic Press, London and New York.
4. *Arguilla E. R.* Intra-nuclear localization of insulin in normal and diabetic mice. 67th Annual Meeting of the American Association of Pathology and Bacteriology, 1970, p. 69a.
5. *Ascoli M., Puett D.* Intracellular uptake and catabolism of lutropin by testicular tissue in vivo. — *FEBS Lett.*, 1977, 75, 77—82.
6. *Ashford T. P., Porter K. R.* Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. — *J. Cell Biol.*, 1962, 12, 198—202.
7. *Banon P., Brandes D., Frost J. K.* Lysosomal enzymes in the rat ovary and endometrium during the estrous cycle. — *Acta Cytol.*, 1964, 8, 416—525.
8. *Barnett R. J., Ball E. G.* Metabolic and ultrastructural changes induced in adipose tissue by insulin. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 8, 83.
9. *Bennet H. S.* The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, Suppl. 2, 99—103.
10. *Bennett H. S.* The cell surface: Movements and recombinations. In: *Handbook of Molecular Cytology*, ed. by A. Lima-de-Faria, 1969, p. 1294—1319. North Holland, Amsterdam.
11. *Bergeron J. J. M., Evans W. H., Geschwind I. I.* Insulin binding to rat liver Golgi fractions. — *J. Cell Biol.*, 1973, 59, 771—776.
12. *Berlin R. D., Oliver J. M., Ukena P. E., Yin H.-H.* Control of cell surface topography. — *Nature*, 1974, 247, 45—46.
13. *Bhalla V. K., Haskell J., Grier H., Mahesh V. B.* Gonadotropin binding factor(s). Extraction of high affinity gonadotropin binding sites from rat testis and partial characterization of their interaction with human follitropin, lutropin, and choriogonadotropin. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 4947—4958.
14. *Bockaert J., Hunzicker-Dunn M., Birnbaumer L.* Hormone-stimulated desensitization of hormone-dependent adenylyl cyclase. Dual action of luteinizing hormone on pig Graafian follicle membrane. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 2653—2663.
15. *Brandt P. W.* A study of the mechanism of pinocytosis. — *Exp. Cell Res.*, 1958, 15, 300—313.
16. *Braun T., Sepsenwol S.* LH and FSH stimulation of adenylate cyclase in seminiferous tubules from young rats: Functional FSH and LH receptors unmasked by homogenization. — *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1976, 4, 183—194.
17. *Brown M. S., Goldstein J. L.* Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. — *Science*, 1976, 191, 150—154.
18. *Brush J. S., Kitabchi A. E.* Metabolic disposition of [<sup>131</sup>I] iodoinsulin within the rat diaphragm. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1970, 215, 134—144.
19. *Cardella C. J., Davies P., Allison A. C.* Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages. — *Nature*, 1974, 247, 46—48.
20. *Carpenter G., Cohen S.* <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. — *J. Cell Biol.*, 1976, 71, 159—171.
21. *Castro A. F., Alonso A., Mancini R. E.* Localization of folliclestimulating and luteinizing hormones in the rat testis using immunohistological tests. — *J. Endocrinol.*, 1972, 52, 129—136.
22. *Castro A. E., Seiguer A. C., Mancini R. E.* Electron microscopic study of the localization of labelled gonadotrophins in the Sertoli and Leydig cells of the rat testis. — *Proc. Soc. Esp. Biol. Med.*, 1970, 133, 582—586.

23. *Catt K. J., Dufau M. L.* Peptide hormone receptors. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1977, 39, 529—557.
24. *Chen T. T., Abel J. H. Jr., McClellan M. C., Sawyer H. R., Dickman M. A., Nishwender G. D.* Localization of gonadotropic hormones in lysosomes of ovine luteal cells. — *Cytobiologie*, 1977, 14, 412—420.
25. *Connell C. J.* The effect of HCG on pinocytosis within the canine inter-Sertoli cell tight junction. A preliminary report. — *Am. J. Anat.*, 1977, 148, 149—153.
26. *Coulson P., Liu T.-C., Morris P., Gorski J.* Interaction of LH with the ovary. — In: *Gonadotropins*, ed. by B. B. Saxena C. G. Beling, H. M. Gandy, 1972, p. 227—247, Wiley — Interscience, New York.
27. *Dales S.* The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid. — *J. Cell Biol.*, 1963, 18, 51—72.
28. *Dal Lago A., Rolandi M. T., Bortolussi M., Galli S.* Direct binding of radioiodinated human chorionic gonadotrophin to frozen sections of rat testis. — *J. Reprod. Fert.*, 1975, 43, 123—126.
29. *Dal Lago A., Rolandi M. T., Galli S., Bortolussi M.* A histochemical approach to the study of human chorionic gonadotrophin receptors in the rat testis. — *Acta Endocrinol.*, 1976, 81, 185—197.
30. *Danzo B. J.* Characterization of a receptor for human chorionic gonadotrophin in luteinized rat ovaries. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 304, 560—569.
31. *De Duve.* The lysosome. — *Sci. Amer.*, 1963, 208 (5), 64—72.
32. *De Duve C.* The lysosome in retrospect. — In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, v. 1, ed. by J. T. Dingle, H. B. Fell, 1969, p. 3—40. North Holland, Amsterdam.
33. *DeMeyts P., Kahn C. R., Roth J., Bar R. S.* Hormonal regulation of the affinity and concentration of hormone receptors in target cells. — *Metabolism*, 1976, 25, 1365—1371.
34. *Desjardins C., Zeleznik A. J., Midgley A. R., Jr., Reichert L. E. Jr.* In vitro binding and autoradiographic localization of human chorionic gonadotrophin and follicle stimulating hormone in rat testes during development. — In: *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*, ed. by M. L. Dufau, A. R. Means, 1974, p. 221—235. Plenum Press, New York.
35. *Dott H. M.* Lysosomes and lysosomal enzymes in the reproductive tract. — In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, v. 1, ed. by J. T. Dingle, H. B. Fell, 1969, p. 330—360. North Holland, Amsterdam.
36. *Eriksson J. L., Brunk U. T.* Alterations in lysosomal membranes as related to disease processes. — In: *Pathology of Cell Membrane*, v. 1, ed. by B. F. Trump, A. U. Arstila, 1975, p. 217—253. Academic Press, New York.
37. *Fawcett D. W., Long J. A., Jones A. L.* The ultrastructure of endocrine glands. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1969, 25, 315—380.
38. *Fendler J. H., Romero A.* Liposomes as drug carriers. — *Life Sci.*, 1977, 20, 1109—1120.
39. *Gavin J. R., III, Buell D. N., Roth J.* Water-soluble insulin receptors from human lymphocytes. — *Science*, 1972, 178, 168—169.
40. *Gavin J. R., Roth J., Neville D. M., deMeyts P., Buell D. N.* Insulin dependent regulation of insulin receptor concentrations: A direct demonstration in cell culture. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 84—88.
41. *Goldfine I. D.* Does insulin need a second messenger? — *Diabetes*, 1977, 26, 148—155.
42. *Goldfine I. D., Smith G. J.* Binding of insulin to isolated nuclei. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 1427—1431.
43. *Goldfine I. D., Smith G. J., Wong K. Y., Jones A. L.* Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes — evidence for potential intracellular sites of insulin action. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 1368—1372.
44. *Gourdji D., Trixier-Vidal A., Morin A., Pradelles P., Morgat J.-L., Formageot P., Kerdelhue B.* Binding of a tritiated thyrotropin-releasing factor to a prolactin secreting clonal cell line (GH 3). — *Exp. Cell. Res.*, 1973, 82, 39—46.

45. Greenspan F. S., Hargadine J. R. The intracellular localization of pituitary thyrotropic hormone. — *J. Cell Biol.*, 1965, 26, 177—185.
46. Han S. S., Cho M. I., Midgley A. R. Jr. Intracellular fate of <sup>125</sup>I-hCG in preovulatory follicular cells in rats. — *Anat. Rec.* 1977, 187, 598.
47. Hill M., Hillova J. Integration of mouse DNA into chicken cell genome in vitro. — In: *Informative Molecules in Biological Systems*, ed. by L. Ledoux, 1971, p. 113—120. North Holland, Amsterdam.
48. Horvat A., Li E., Kotsyannis P. G. Cellular binding sites for insulin in rat liver. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 382, 609—620.
49. Hsueh A. J. W., Dufau M. L., Catt K. J. Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3',5'-cyclic AMP and testosterone responses. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 592—595.
50. Hutson J. C., Gardner P. J., Moriarty G. C. Immunocytochemical localization of an FSH-like molecule in the testis. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, 25, 1119—1126.
51. Jacques P. J. The endocytic uptake of macromolecules. — In: *Pathology of Cell Membranes*, v. 1, ed. by B. F. Trump, A. U. Arstila, 1975, p. 255—282. Academic Press, New York.
52. Kahn C. R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. — *J. Cell Biol.*, 1976, 70, 261—287.
53. Kahn C. R., Megyesi K., Bar R. S., Eastman R. C., Flier J. S. Receptors for peptide hormones. — *Ann. Intern. Med.*, 1977, 86, 205—219.
54. Kolodny G. M. Transfer of cytoplasmic and nuclear proteins between cells in culture. — *J. Mol. Biol.*, 1973, 78, 197—210.
55. Laval F., Malaise E., Laval J. Uptake and fate of bacterial DNA in mice fibroblasts in vitro. — In: *Informative Molecules in Biological Systems*, ed. by L. Ledoux, 1971, p. 124—134. North Holland, Amsterdam.
56. Lee N. D., Williams R. H. The intracellular localization of labeled thyroxine and labeled insulin in mammalian liver. — *Endocrinology*, 1954, 54, 5—19.
57. Leleux P., Robyn C. Étude en immunofluorescence d'une réaction immunologique croisée entre les gonadotropines humaines et les gonadotropines du rat. — *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 1970, 31, 181—191.
58. Lin S.-T., Goodfriend T. L. Angiotensin receptors. — *Am. J. Physiol.*, 1970, 218, 1319—1328.
59. Mancini R. E., Castro A. E., Seiguer A. C. Histologic localization of follicle-stimulating and luteinizing hormones in the rat testis. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1967, 15, 516—525.
60. Mason T. C., Phifer R. F., Spicer S. S., Swallow R. A., Dreskin R. B. An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1969, 17, 563—569.
61. Mayer M. M. Mechanisms of cytolysis by complement. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 2954—2958.
62. McKerns K. W. Gonadotropin regulation of nucleotide biosynthesis in corpus luteum. — *Biochemistry*, 1973, 12, 5206—5211.
63. McKerns K. W. Stimulation of RNA synthesis in corpora lutea nuclei by human chorionic gonadotropin in vitro. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 349, 465—468.
64. McKerns K. W., Ryschkewitsch W. Interaction of luteinizing hormone and its subunits in corpus luteum supernatant. — *Endocrinology*, 1974, 95, 847—853.
65. Midgley A. R., Jr. Gonadotropin binding to frozen sections of ovarian tissue. — In: *Gonadotropins*, ed. by B. B. Saxena, C. G. Beling, H. M. Gandy, 1972, pp. 248—260. Wiley — Interscience, New York.
66. Monroe S. E., Midgley A. R., Jr. Localization of luteinizing hormone in the rat pituitary gland by a cross-reaction with antibodies to human chorionic gonadotropin. — *Fed. Proc.*, 1966, 25, 315.
67. Müller-Eberhard H. J. Complement. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, 44, 697—724.
68. Mullin B. R., Lee G., Ledley F. D., Winand R. J., Kohn L. D. Thyrotropin interactions with human fat cell membrane preparations and the finding

- of a soluble thyrotropin binding component. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 55—63.
69. *Murphy H. D.* Sertoli cell stimulation following intratesticular injections of FSH in the hypophysectomized rat. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965, 118, 1202—1205.
  70. *Nolin J. M., Witorsch R. J.* Detection of endogenous immunoreactive prolactin in rat mammary epithelial cells during lactation. — *Endocrinology*, 1976, 99, 949—959.
  71. *Nordquist R. E., Palmeri G. M. A.* Intracellular localization of parathyroid hormone in the kidney. — *Endocrinology*, 1974, 95, 229—237.
  72. *Novikoff A. B.* Lysosomes and related particles. — In: *The Cell*, v. 2, ed. by J. Brachet, A. E. Mirsky, 1961, p. 423—488. Academic Press, New York, London.
  73. *Olsens S., Sandvig K., Refsnes K., Fodstad O., Pihl A.* Binding and uptake of the toxic lectins abrin and ricin by mammalian cells. — In: *Surface Membrane Receptors*, ed. by R. A. Bradshaw, W. A. Frazier, R. C. Merrvell, D. I. Gottlieb, R. A. Hogue-Angeletti, 1975, p. 179—192. Plenum Press, New York, London.
  74. *Palade G. E.* Fine structure of blood capillaries. — *J. Appl. Phys.*, 1953, 24, 1424.
  75. *Palade G. E.* The endoplasmic reticulum. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, Suppl. 2, 85—98.
  76. *Pappenheimer A. M., Jr., Gill D. M.* Diphtheria. — *Science*, 1973, 182, 353.
  77. *Parlow A. F.* Bio-assay of pituitary luteinising hormone by depletion of ovarian ascorbic acid. — In: *Human Pituitary Gonadotropins*, ed. by A. Albert, 1973, p. 300—310. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
  78. *Pierce J. G., Faith M. R., Guidice L. C., Reeve J. R.* Structure and structure-function relationship in glycoprotein hormones. — In: *Polypeptide Hormones: Molecular and Cellular Aspects*, ed. by R. Porter, D. W. Fitzsimmons, 1976, p. 225—243. Elsevier, Amsterdam.
  79. *Petrusz P.* Demonstration of gonadotrophin binding sites in the rat ovary by an immunoglobulin-enzyme bridge method. — *Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.*, 1974, Suppl. 4, 3—10.
  80. *Petrusz P.* Immunoperoxidase localization of gonadotropin binding sites in ovaries of intact immature rats — *Anat. Rec.*, 1974, 178, 437—438.
  81. *Petrusz P., DiMeo P., Ordronneau P., Weaver C., Keefer D. A.* Improved immunoglobulin-enzyme bridge method for light microscopic demonstration of hormone-containing cells of the rat adenohypophysis. — *Histochemistry*, 1975, 46, 9—26.
  82. *Petrusz P., Sar M., Ordronneau P., DiMeo P.* Specificity in immunocytochemical staining. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1976, 24, 1110—1112.
  83. *Petrusz P., Uhlarik A.* Light microscopic localization of binding sites for human chorionic gonadotrophin in luteinized rat ovaries by a peroxidase-labeled antibody method. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, 21, 279—282.
  84. *Rao C. V., Saxena B. B., Gandy H. M.* Subcellular distribution of HCG in the rat corpus luteum. — In: *Gonadotropins*, ed. by B. B. Saxena, C. G. Belling, H. M. Gandy, 1972, p. 261—268. Wiley-Interscience, New York.
  85. *Richards J. S., Ireland J. J., Rao M. C., Bernath G. A., Midgley A. R., Jr., Reichert L. E.* Ovarian Follicular development in rat — hormone regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. — *Endocrinology*, 1976, 99, 1562—1570.
  86. *Ryser H. J.-P.* Uptake of protein by mammalian cells: An underdeveloped area. — *Science*, 1968, 159, 390—396.
  87. *Sar M., Petrusz P., Stumpf W. E.* Distribution of  $^{125}\text{I}$  prolactin in the ovary of pseudopregnant rats studied by autoradiography. — 57th Annual Meeting of the Endocrine Society, 1975, p. 331.
  88. *Sar M., Stumpf W. E., Petrusz P.* Cellular localization of  $^{125}\text{I}$ -FSH in rat ovary. — 9th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 1976, p. 55.
  89. *Seljelid R.* Electron microscopic localization of acid phosphatase in rat thyroid follicle cells after stimulation with thyrotropic hormone. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1965, 13, 687—690.

90. *Sharpe R. M.* hCG induced decrease in availability of rat testis receptors. — *Nature*, 1976, 264, 644—645.
91. *Silverstein S. C., Dales S.* The penetration of reovirus RNA and initiation of its genetic function in L-strain fibroblasts. — *J. Cell Biol.*, 1969, 36, 197—230.
92. *Stein P., Gross J.* The localization and metabolism of  $I^{131}$  insulin in the muscle and some other tissues of the rat. — *Endocrinology*, 1959, 65, 707—716.
93. *Sternberger L. A., Petralli J. P.* Hormone receptors: Light and electron immunocytochemical localization of the target cell receptors for adrenocorticotropin (ACTH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH). — *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, 22, 296—297.
94. *Sternberger L. A., Petralli J. P.* Quantitative immunocytochemistry of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone. — *Cell Tissue Res.*, 1975, 162, 141—176.
95. *Straus W.* Lysosomes, phagosomes and related particles. — In: *Cytology*, ed. by D. B. Roodyn, 1967, p. 239—319. Academic Press, London and New York.
96. *Straus W., Oliver J.* Cellular mechanisms of protein metabolism in the nephron. VI. The immunological demonstration of egg white in droplets and other cellular fractions of the rat kidney after intraperitoneal injections. — *J. Exp. Med.*, 1955, 102, 1—9.
97. *Sulimovici S., Bartoov B., Lunensfeld B.* Rat testis mitochondrial adenylate cyclase. Partial purification and characterization. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 377, 454—462.
98. *Sulimovici S., Lunensfeld B.* The effect of gonadotropins on the mitochondrial adenylate cyclase of rat testis. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 55, 673—679.
99. *Sutherland E. W., Oye I., Butcher R. W.* The action of epinephrine and the role of adenyl cyclase system in hormone action. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1965, 21, 623—642.
100. *Szego C. M.* The lysosome as a mediator of hormone action. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1974, 30, 171—223.
101. *Szego C. M.* Lysosomal function in nucleocytoplasmic communication. — In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, v. 4, ed. by J. T. Dingle, R. T. Dean, 1975, p. 385—477. North Holland, Amsterdam.
102. *Taylor R. B., Duttus P. H., Raff M. C., de Petris S.* Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. — *Nature New Biol.*, 1971, 233, 225—229.
103. *Unanue E. R., Perkins W. D., Karnovsky M. J.* Lignand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence ultrastructural radioautography. — *J. Exp. Med.*, 1972, 136, 885—906.
104. *Vaes G.* Excretion of acid lysosomal hydrolytic enzymes during bone resorption induced in tissue culture by parathyroid extract. — *Exp. Cell Res.*, 1965, 39, 470—474.
105. *Van Heyningen W. E.* Membrane receptors for bacterial toxins. — In: *Surface Membrane Receptors*, ed. by R. A. Bradshaw, W. A. Frazier, R. C. Merrell, D. I. Gottlieb, R. A. Hogue-Angeletti, 1975, p. 147—167. Plenum Press, New York and London.
106. *Welzel B. K., Spicer S. S., Wollman S. H.* Changes in the fine structure and acid phosphatase localization in rat thyroid cells following thyrotrophin administration. — *J. Cell Biol.*, 1965, 25, 593—618.
107. *Wolman S. H., Spicer S. S., Burstone M. S.* Localization of esterase and acid phosphatase in granules and colloid droplets in rat thyroid epithelium. — *J. Cell Biol.*, 1964, 21, 191—201.
108. *Yang K.-P., Samaan N. A., Ward D. N.* Characterization of an inhibitor for luteinizing hormone receptor site binding. — *Endocrinology*, 1976, 98, 233—241.
109. *Zor U., Lamprecht S. A., Misulovin Z., Koch Y., Linder H. R.* Refractoriness of ovarian adenylate cyclase to continued hormonal stimulation. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 428, 761—765.

## МЕСТА СВЯЗЫВАНИЯ И МЕТАБОЛИЗМ ГОНАДОТРОПНЫХ ГОРМОНОВ В ЯИЧНИКЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ДЖ. Х. АБЕЛЬ, Т. Т. ЧЕН, Д. В. ЭНДРЕС, М. К. МАК-КЛЕЛЛАН,  
М. А. ДЕЙКМАН, Х. Р. СОЙЕР, ДЖ. Д. НИСВЕНДЕР, М. Х. Л. ШМИТЦ,  
М. П. ПИНЕДА

(J. H. ABEL, T. T. CHEN, D. V. ENDRES, M. C. MCCLELLAN, M. A. DIEKMAN,  
H. R. SAWYER, G. D. NISWENDER, M. H. J. SCHMITZ, M. P. PINEDA)

*Отдел физиологии и биофизики, Университет штата Колорадо,  
Форт Коллинз, Колорадо 80523, США*

В предыдущих работах нашей лаборатории было показано, что зернистые клетки в полностью функциональном желтом теле из яичников собак и овец обладают извилистой и высокоразвитой базальной поверхностью [1—4, 35]. При этом удается выявить три уровня организации: большие плеоморфные цитоплазматические складки, глубоко вдающиеся в перикапиллярное пространство; более мелкие гребни и складки, удерживаемые вместе в структурах типа перегородчатых соединений; микроворсинки. Базальная поверхность яичников у овец развита несколько меньше, чем у собак. Суммарная площадь поверхности, однако, у обоих видов практически одинакова, поскольку у овец большая доля периферии клеток экспонирована в перикапиллярное пространство. Мультивезикулярные тела (МВТ) обнаруживаются повсеместно на базальных окончаниях клеток и обычны для цитоплазмы складок, гребней и щелей. В свою очередь МВТ окружены покрытыми везикулами, которые нередко с ними сливаются. Полости или покрытые углубления также обнаруживаются по базальной плазматической мембране, особенно на участках, прилегающих к МВТ.

Эти наблюдения представляют интерес, поскольку во многих исследованиях покрытые углубления связываются с лизосомами и с валовым транспортом питательных материалов в клетки для внутреннего потребления [5, 18, 19, 31, 40, 41, 52]. Недавно было показано участие системы покрытые везикулы — лизосомы в захвате и метаболизме гонадотропных пептидных гормонов, связавшихся со специфическими высокоаффинными рецепторами на своих клетках-мишенях [12, 14, 50]. В двух описанных случаях — для фактора роста эпидермиса на фибробластах [12] и для инсулина на гепатоцитах крыс [50] — показано, что гормоны, будучи включенными в лизосомы, быстро разлагаются на составляющие их аминокислоты. Эти данные хорошо согласуются с нашими морфологическими наблюдениями и позволяют сформулировать гипотезу о том, что яичник может обладать внутренним механизмом для разрушения, по крайней мере частично, связавшихся с ним тропных гормонов. Мы изложим результаты экспериментов, проведенных для проверки этой гипотезы и выяснения следующих вопросов: а) активно ли вовлечены в эндоцитоз зернистые клетки желтого тела, б) оказываются ли связанные с клетками гонадотропины в МВТ, в) обладают ли МВТ кислыми гидролазами, способными осуществлять процессы разрушения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Эксперименты с пероксидазой

*In vivo*: суперовуляцию у 3 овец вызывали ранее описанным способом [46]. 200 мкл 2% пероксидазы хрена (тип VI, Sigma) вводили в артерию яичника на 10-й день после овуляции. Желтое тело яичников удаляли через 0,5, 20 и 80 мин после окончания инъекции. Из центральной части каждой железы брали тонкие срезы (толщиной около 1 мм) и инкубировали их в 4% глутаровом альдегиде, забуференном 0,1 М какодилатом, и в присутствии 5% сахарозы при pH 7,4 в течение 30 мин при 4°С. После нескольких промывок какодилатным буфером срезы использовали для цитохимического определения локализации пероксидазы по методу Graham и Karnovsky [24]. В качестве контроля срезы инкубировали в полной среде, лишенной лишь диаминобензидина или перекиси водорода. После отмывки все образцы подвергали фиксации в 2% растворе четырехоксида осмия, забуференного 0,1 М какодилатом, при pH 7,2 и при 4°С в течение ночи, а затем дегидратировали этанолом и окрашивали в блоке 0,5% уранилацетатом. Сверхтонкие срезы изучали на электронном микроскопе «Siemens Elmiskop 1A» при напряжении 80 кВ, а срезы толщиной 1 мкм — на высоковольтном электронном микроскопе при 1000 кВ.

*In vitro*: клетки выделяли из желтого тела в соответствии с методом Simmons и др. [47]. В одной культуральной пробирке инкубировали 1 млн. клеток в присутствии 2% раствора пероксидазы хрена (тип VI, Sigma) в течение 10 мин при или без преинкубации с NIH-LH в течение 30 мин и в дозе 2 мкг/мл. Затем клетки осаждали, промывали, ресуспендировали и через 5, 30 или 90 мин дополнительной инкубации фиксировали в 4% глутаровом альдегиде. Затем клетки готовили для цитохимического ферментного анализа описанным выше способом.

### Эксперименты с гормонами

#### Авторадиография и иммуноцитохимия

Высокоочищенный хорионгонадотропин (ХГТ) в количестве 10 мкг подвергали радиоiodированию действием 2 мКи  $^{125}\text{I}$  по лактопероксидазному методу [37]. После iodирования реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-25 для отделения свободного  $\text{Na-}^{125}\text{I}$  от iodированного ХГТ. Белковые фракции соединяли и подвергали повторной очистке на сефадексе G-25 для полного удаления  $\text{Na-}^{125}\text{I}$  из раствора. Специфическая активность  $^{125}\text{I}$ -ХГТ составляла около 20—35 мКи/мкг. В яичниковую артерию 12 овец с нормальным циклом утром 9-го дня течки в течение 2 мин вводили 2 мл раствора меченого ХГТ ( $1,3 \cdot 10^9$  dpm). Животных разделяли на четыре группы (по 3 жи-

вотных) и в каждой из групп производили выделение желтого тела яичника через 10, 30, 90 или 270 мин после инъекции. Образцы удаленных желтых тел использовали для автордиографической и иммуоцитохимической локализации ХГТ. У 5 животных желтое тело находилось в обоих яичниках: в этих случаях с противоположной стороны его также удаляли и определяли его радиоактивность. Двум контрольным животным вводили свободный  $\text{Na-}^{125}\text{I}$  ( $1,0 \cdot 10^9$  dpm) или  $^{125}\text{I}$  меченый бычий сывороточный альбумин (БСА) ( $1,2 \cdot 10^9$  dpm) для определения степени специфичности связывания  $^{125}\text{I}$ -ХГТ. Каждому из 8 дополнительных животных на 9-й день течки в яремную вену вводили 2 мг NIH-LH-S12 и удаляли желчное тело через 10, 30, 90 или 270 мин после инъекции, определяя в образцах локализацию ЛГ иммуоцитохимическим методом. Связывание  $^{125}\text{I}$ -ХГТ ( $3 \cdot 10^6$  dpm) изучали также в условиях *in vitro* с использованием суспензии примерно  $4 \cdot 10^6$  энзиматически разъединенных клеток желтого тела на пробирку (47). Инкубацию проводили в четырех повторах в среде № 199 (Grand Island Biological Co., Grand Island, N. в течение 10, 30, 90 и 270 мин. Дополнительно 1 мг NIH-LH-S12 добавляли в 2 пробирки для каждого времени с целью определения специфичности связывания  $^{125}\text{I}$ -ХГТ.

Срезы тканей или осажденные клетки фиксировали в течение 3 ч в 2% глutarовом альдегиде в 0,75 М какодилатном буфере, содержащем 7% сахарозы при pH 7,4. Фиксацию производили при 4° С. Образец помещали в гамма-счетчик для определения включенной радиоактивности и затем заливали парафином или эпоном. Иммуоцитохимическое окрашивание проводили по модифицированному методу Sternberg [14]. Различные чередования первичных и вторичных антител, а также пероксидаза-антипероксидазных комплексов были использованы для доказательства специфичности реакции. Автордиографические эксперименты с помощью световой и электронной микроскопии проводили с использованием фотоэмульсий «Kodak NTB-3» и «Ilford L-4» соответственно.

### Кинетика связывания и метаболизма гормона

Крупные клетки желтого тела в количестве 0,5 млн. помещали в каждую из 20 культуральных пробирок и добавляли к ним  $10 \cdot 10^6$  имп/мин  $^{125}\text{I}$ -ХГТ (60 мкКи/мкг). По истечении 3 ч инкубации клетки несколько раз промывали и реинкубировали в свежей среде с интервалами в 2½ ч в течение 10 ч. Каждая промывка продолжалась 1 ч, что продлевало общее время манипуляций после введения радиоактивности до 14 ч. В конце каждого 2½-часового периода клетки осаждали, а супернатант собирали и анализировали. Радиоактивно меченные компоненты супернатанта разделяли на колонке сефадекса G-25. Биологическую активность выделенных индивидуальных меченных компонентов супернатанта оценивали по их способности связываться с избытком мембранных рецепторов.



Мембранные фракции получали следующим способом: 1 г ткани желтого тела овец, находящихся в середине эстрального цикла, гомогенизировали на политропе при  $4^{\circ}\text{C}$  в 10 мл 0,05 М трис- $\text{HCl}$ , рН 7,2, в присутствии 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Гомогенат центрифугировали в течение 30 мин при 120 g, удаляли осадок и супернатант вновь подвергали центрифугированию в течение 30 мин при 37 000 g. Супернатант удаляли, осадок промывали, ресуспендировали и центрифугировали еще 2 раза. Аликвоты мембранной фракции замораживали в сухом льду в смеси с ацетоном и хранили таким образом до момента использования. Для оценки связывания 0,5 мл очищенной мембранной фракции в  $\text{CaCl}_2$  и желатинизированном трис-буфере, содержащем 0,1% желатина, добавляли к 0,5 мл супернатанта, полученного из суспензий клеток, и инкубировали в течение 16 ч при  $25^{\circ}\text{C}$ . Затем смесь центрифугировали в течение 30 мин при 2380 g, промывали, повторно центрифугировали и просчитывали на гамма-счетчике.

### Цитохимическая локализация кислой фосфатазы и других гидролаз

Овец дважды в день проверяли на течку с использованием баранов с удаленными семявыводящими протоками до установления по меньшей мере двух последовательных нормальных циклов — 16—18 дней. Были отобраны 24 овцы, обнаружившие течку впервые в определенный день (день 0), и у них было произведено удаление желтого тела яичников на 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 или 17-й день цикла течки. У 8 дополнительных животных по описанному методу [46] была вызвана овуляция. У 6 из этих животных были также взяты пробы крови из питающей яичники артерии со стороны желтого тела для определения общего кровотока в яичниках. Всем 8 животным были сделаны 2 инъекции по 5 мг  $\text{PGF}_2\alpha$  на 12-й день цикла с интервалом 2 ч, после чего удалено желтое тело яичников через 6, 12, 24 или 36 ч после заключительной инъекции. Определение концентрации прогестерона в тканях проводили радиоиммунологически [36] после экстракции с петролейным эфиром. Для определения потерь гормона в процессе манипуляций в систему добавляли тритированный прогестерон. После удаления желтого тела его немедленно взвешивали и из центра железы брали тонкий срез (примерно 1 мм толщиной), который делили пополам. Половину среза погружали в 4% глутаровый альдегид, забуференный 0,1 М какодилатом рН 7,4, содержащий дополнительно 7% сахарозы, а другую половину помещали в фиксирующую смесь по Karnovsky [30] на 10 мин при комнатной температуре. Остаток желтого тела замораживали в жидком азоте. Ткань, фиксированную по методу Karnovsky, помещали на  $2\frac{1}{2}$  ч на лед, в течение ночи промывали какодилатным буфером и нарезаали на кусочки толщиной 25—50 мкм на микротоме «Oxford Vibratome». Эти срезы были использованы для цитохимического определения кислой фосфатазы по описанному методу

[10]. Контрольные образцы инкубировали в присутствии  $5 \cdot 10^{-3}$  М фторида натрия. При определении кислой фосфатазы через  $1\frac{1}{2}$  или 1 ч инкубации при температуре  $37^\circ\text{C}$  срезы промывали соответствующими буферными растворами и изучали с помощью электронной микроскопии при разности потенциалов 80 или 1000 В.

Активность кислой фосфатазы определяли количественно по методу Barrett [6]. Отсчет времени инкубации начинали с момента добавления субстрата и заканчивали в момент добавления в систему 1М NaOH и погружения образца в ледяную баню. Конечное значение pH образца составляло больше 11. Специфическую активность выражали как количество микромолей выделившегося паранитрофенола на 1 мг белка в течение часа.

Распределение арилсульфатазы [25], неспецифической эстеразы [11] и  $\beta$ -глюкуронидазы [26] изучали в желтых телах на протяжении всего цикла. Для этого образцы ткани фиксировали 10% параформальдегидом в течение 6 ч в присутствии содержащего 5% сахарозы 0,05 М какодилатного буфера при pH 7,2. Затем препарат ткани замораживали в жидком пропане, суспендированном в жидком азоте, делали срезы толщиной 3 мкм на микротоме «International Cryostat» и изучали образцы на световом микроскопе.

### Электронно-микроскопическая автордиография секреторных гранул и покрытых везикул

Для выяснения, оказываются ли мембраны гранул, производных от телец Гольджи, встроенными в плазмолемму, электронно-микроскопические автордиограммы получали через различные временные интервалы инкубации срезов желтого тела в смеси  $^3\text{H}$ -аминокислот или в  $^3\text{H}$ -фукозе. Срезы инкубировали в течение 5 мин при  $37^\circ\text{C}$  в 2 мл буфера Кребса — Рингера, содержащего дополнительно 2 мг/мл глюкозы, следы триптофана и метионина, 100 нг/мл ЛГ (NIH-LH-S17) и 100 мкКи смеси  $^3\text{H}$ -аминокислот (New England Nucleon) или  $^3\text{H}$ -фукозы (New England Nucleon). Затем срезы инкубировали в 5 мл среды № 199, содержащей 100-кратный избыток нерадиоактивных аминокислот, дополнительно в течение 3, 9, 27, 81 или 243 мин (по 3 среза на каждое время). В течение продолжительных периодов инкубации среду меняли каждые 27 мин.

После инкубации срезы разрезали пополам и взвешивали. Половину фиксировали в глутаровом альдегиде и готовили для электронной микроскопии, а другую половину замораживали в жидком азоте. Из трех отдельных блоков для каждого времени инкубации делали срезы толщиной 1 мкм, помещали их на стеклянные пластинки покрывали эмульсией «Kodak NTB-3». Эмульсию проявляли через 5 дней и срезы изучали методом фазового контраста с целью выбора участков для электронно-микроскопической автордиографии по методу Cher и др. [14].

Через 8 ч и 8 дней после введения ХГТ в питающую личинки

артерию суперовулированных овец вводили немеченую фукозу, а через 2 мин после этого делали инъекцию в 10 раз меньшей дозы  $^3\text{H}$ -фукозы (доза по радиоактивности 500 мкКи) в забуференном фосфатом растворе соли. Желтые тела выделяли через интервалы от 15 мин до 17 ч после инъекции меченой фукозы и по ранее описанной методике готовили образцы для электронно-микроскопической автордиографии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущем разделе Petrusz сделал обзор литературы, относящейся к связыванию гонадотропинов, поэтому далее мы сконцентрируем наше внимание на результатах, полученных в нашей лаборатории, и будем обсуждать данные литературы только при необходимости.

### Пероксидаза и другие экзогенные маркеры

В экспериментах *in vivo*, когда пероксидазу вводили суперовулированным овцам, реакционный продукт заполнял интерстициальное и межклеточное пространство в течение 5 мин после инъекции. Покрытые углубления и везикулы вдоль базальной стороны зернистых клеток желтого тела тоже обнаруживали положительную реактивность (рис. 53). Высоковольтный электронный микроскоп особенно удобен для изучения этих структур, поскольку стереомикрофотографии толстых срезов ткани позволяют отчетливо выявить трехмерную структуру канальцев и покрытых везикул. Через 5 мин большое количество покрытых везикул обнаруживается на плазматической мембране и существует в виде свободно плавающих сфер в цитоплазме (рис. 53, 54). В этот период никакие другие внутриклеточные органеллы не обнаруживают реактивности. Через 20 мин после введения фермента 90% МВТ внутри клеток также обнаруживают реакционный продукт (рис. 55). Метка распределяется внутри основного тела этих структур и не обнаруживается внутри включенных везикул меньшего размера. В противоположность этому через 90 мин реакционный продукт больше не выявляется иногда внутри ткани. Эксперименты с другими экзогенными маркерами, такими, как микропероксидаза, миоглобин и ферритин, дают в основном сходные результаты, за исключением того, что ферритин удается обнаружить в МВТ и через 90 мин. Приведенные данные показывают, что зернистые клетки желтого тела, по-видимому, активно вовлечены в процесс эндоцитоза, образующиеся при этом покрытые везикулы быстро захватываются МВТ и однажды захваченные МВТ молекулы белков претерпевают некое превращение. Последнее заключение вытекает из невозможности обнаружить ферментативную активность по истечении некоторого времени. Таким образом, зернистые клетки желтого тела обладают системой «покрытые углубления — лизосомы», которая уже описана

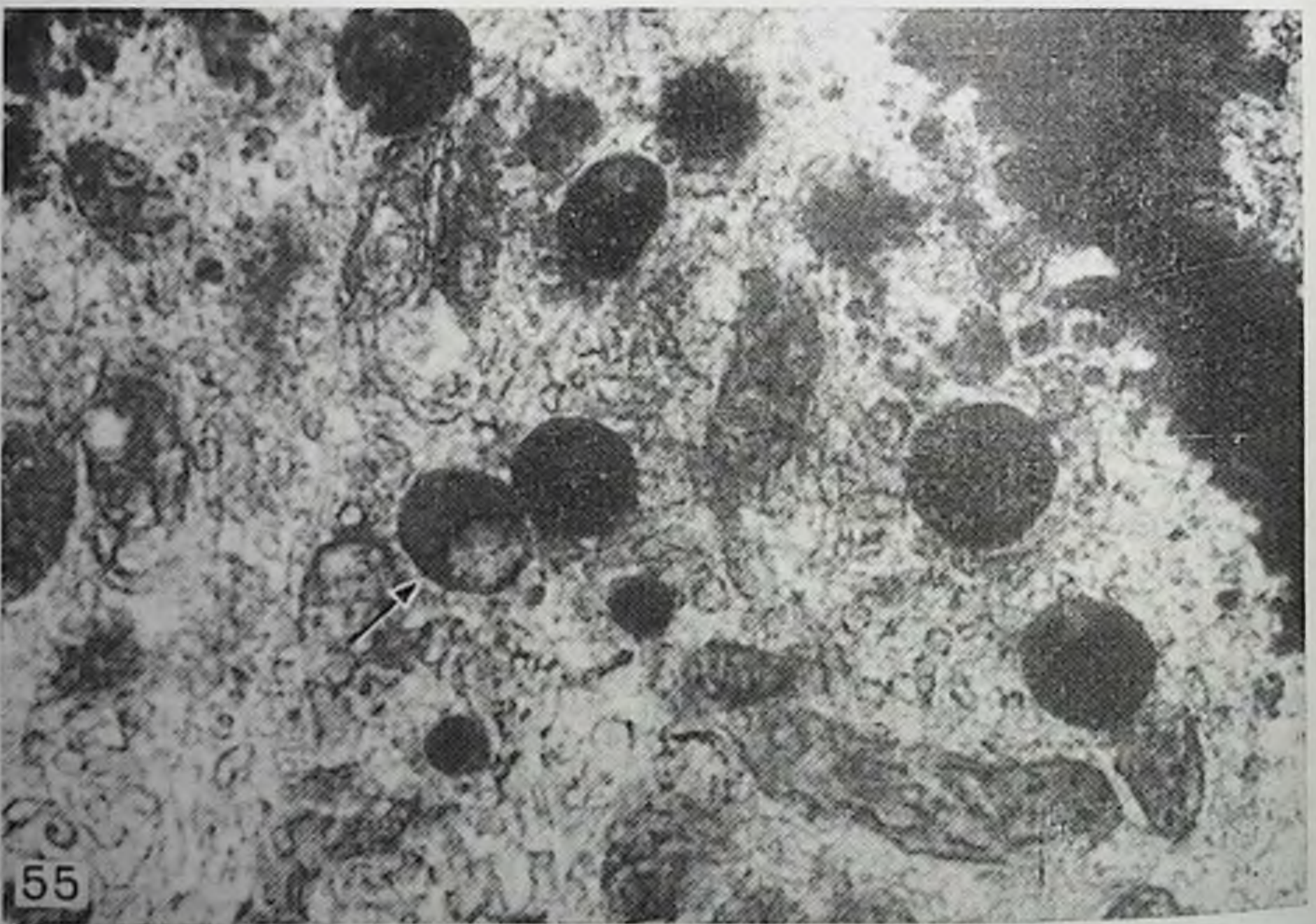
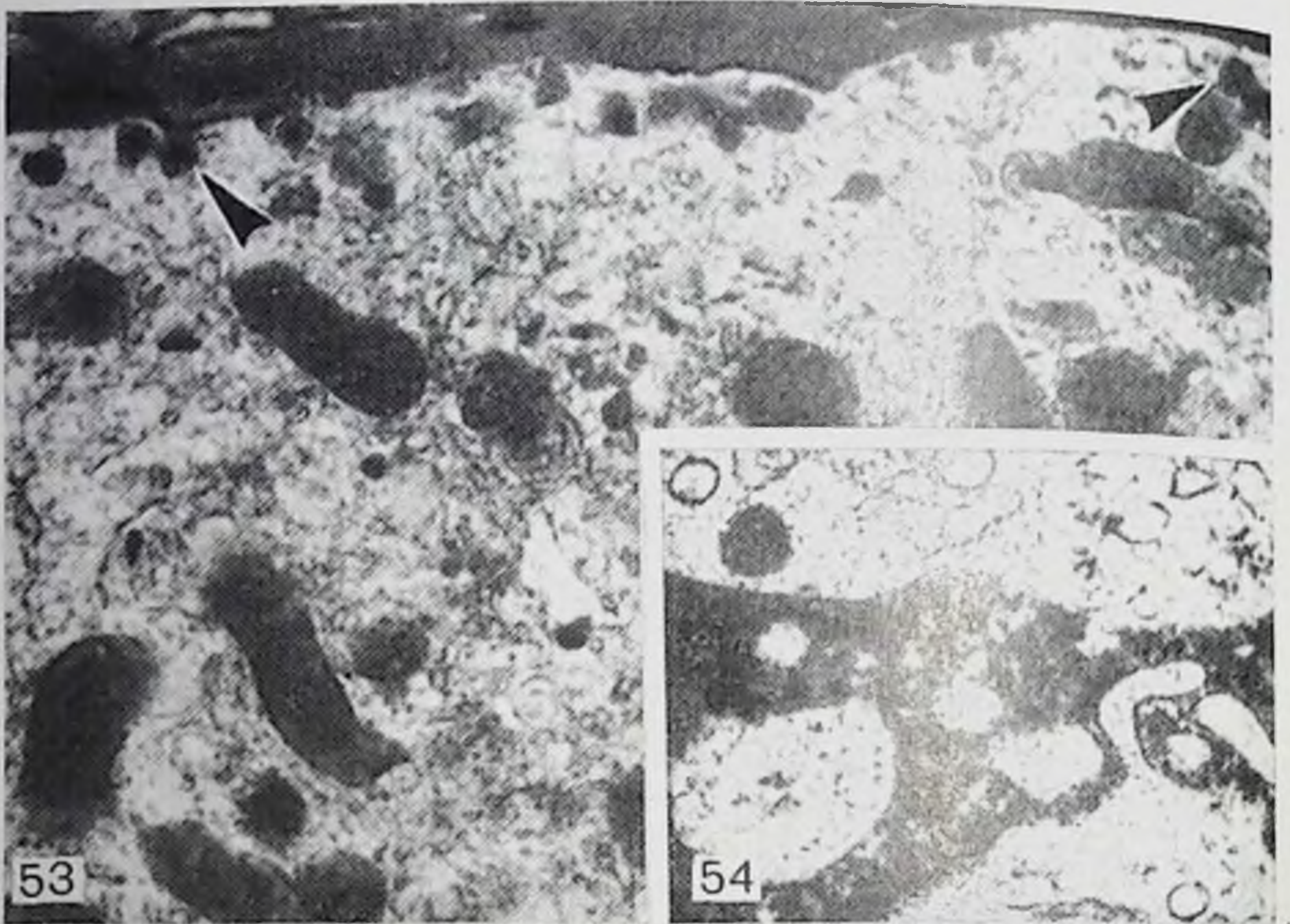


Рис. 53. Полученная с помощью высоковольтного электронного микроскопа фотография части зернистой клетки желтого тела после обработки пероксидазой.

Рис. 54. Небольшая часть двух зернистых клеток желтого тела, расположенных по обеим сторонам интерстициального пространства, окрашенного на снимке в темный цвет продуктами взаимодействия с пероксидазой.

В цитоплазме верхней клетки обнаружили везикулу с покрытием, также заполненную реакционным продуктом. С правого края снимка внизу видны вдавления с покрытием. Ув. 51 300, 80 кВ; снимок сделан через 5 мин после обработки пероксидазой.

для ряда других клеток [5, 18, 19, 31, 40, 41, 52] и вовлечена в транспорт питательных веществ.

Изолированные клетки желтого тела, поддерживаемые в виде культуры в условиях *in vitro*, также способны включать пероксидазную метку. Этот процесс происходит быстрее в клетках, которые были подвергнуты действию гонадотропинов. В обоих случаях МВТ интенсивно метились через 5 мин после удаления среды с ферментом, тогда как их освобождение от реакционного продукта наблюдалось через 30 и 90 мин соответственно. Таким образом, гонадотропины стимулируют, по-видимому, процесс эндотоза.

### Авторадиография и иммуоцитохимия гонадотропинов

Часть обсуждаемых далее данных уже опубликована [2, 3, 14] и будет поэтому описана кратко. Комбинированное использование методов авторадиографии и иммуоцитохимии было вынужденной необходимостью, определяемой рядом технических сложностей, присущих каждому из этих методов. Мы полагаем, однако, что если результаты, полученные каждым из этих методов, будут дополнять друг друга, это сделает их более достоверными.

Меченый радиоактивным йодом ХГТ был использован в этих экспериментах в качестве первого лиганда по нескольким причинам. Прежде всего необходимо было использовать гормон, не имеющийся у овец, чтобы проводить авторадиографические и иммуоцитохимические исследования. Эндогенный или природный ЛГ, который уже присутствует в яичниках, создает фон в тканях, который не может быть отличен от инъецированного ЛГ в иммуоцитохимических реакциях. Биологическая активность радио-йодированного овечьего ЛГ (G3-22b, Parkoff), человеческого ЛГ (LER 960, Reichert) и ХГТ (A347, партия CR 117) была определена по их способности специфически связываться с избытком мембранных рецепторов [Endres, неопубликованные данные]. Радио-йодированные ХГТ, ЛГ овец и ЛГ человека связывались на 60, 30 и 30% соответственно. Кроме того, неспецифическое связывание ЛГ овец в 5 раз превосходит таковое для ХГТ. Специфическое связывание определяли инкубацией в присутствии и в отсутствие 34,1 мкг ХГТ (Organon), содержащего 2,930 МЕ/мг. ЛГ человека и ХГТ ингибировали связывание  $^{125}\text{I}$ -ХГТ параллельно, тогда как эффект ЛГ овец несколько отличался. Связывание

←

Рис. 55. Полученная с помощью высоковольтного электронного микроскопа фотография части зернистой клетки желтого тела через 20 мин после применения пероксидазы. Обнаруживается шесть крупных и два маленьких электронно-плотных мультивезикулярных образования (МВО), наполненных реакционным продуктом. Присутствует также одно МВО, в котором реакционного продукта нет (показано стрелкой). Ув. 21 000.

$^{125}\text{I}$ -ХГТ ингибировалось на 50% в присутствии  $1 \cdot 10^{-10}$  М немеченного ХГТ,  $2 \cdot 10^{-10}$  М ЛГ овец и  $2 \cdot 10^{-10}$  М ЛГ человека. И, наконец, скорости диссоциации комплексов гормона с мембранными рецепторами определяли по удалению несвязанного гормона без добавления избытка немеченного гормона. Степень деградации изучали в параллельных экспериментах, удаляя несвязанный гормон только после инкубации. После инкубации при  $25^\circ\text{C}$  в течение 20 ч 20%  $^{125}\text{I}$ -ХГТ диссоциировал без заметной деградации рецепторов. Суммарная деградация и диссоциация  $^{125}\text{I}$ -ХГТ составляла 10%, тогда как количество связанного в тех же условиях  $^{125}\text{I}$ -овечьего ЛГ понижалось на 50%, из них 20% относилось за счет деградации рецепторов. Немеченные ХГТ и оба типа ЛГ обладали близкой способностью конкурировать за места связывания  $^{125}\text{I}$ -ХГТ, что позволяет сделать вывод о близости значений их равновесных констант диссоциации.  $^{125}\text{I}$ -овечий ЛГ обладал более высокой скоростью диссоциации комплекса гормон — рецептор и более выраженной деградацией рецептора, чем  $^{125}\text{I}$ -ХГТ и  $^{125}\text{I}$ -ЛГ человека. Ответить на вопрос, является ли это различие результатов йодирования ЛГ овец или гормоны сами по себе обладают разными константами скорости ассоциации, не удалось. Таким образом, на основании всех описанных результатов для проведения дальнейших экспериментов был выбран  $^{125}\text{I}$ -ХГТ.

В первых экспериментах  $^{125}\text{I}$ -ХГТ вводили в питающую яичники артерию овец с нормальным циклом, после чего удаляли желтое тело через 10, 30, 90 и 270 мин. Авторадиографические данные, полученные с помощью светового микроскопа, показывают, что первичная волна серебряных зерен, начинающая движение от капилляров и интерстициального пространства через 10 мин, достигает периметра клеток желтого тела через 30 и 90 мин. И, наконец, через 270 мин гранулы локализуются и по периметру клеток и в периферической цитоплазме. Результаты иммуноцитохимических экспериментов в значительной мере подобны приведенным. Через 30 и 90 мин после введения гормона реакционный продукт образует отчетливое кольцо вокруг капсулы и зернистых клеток желтого тела (рис. 57). К 270-й минуте, однако, количество реакционного продукта заметно понижается на поверхности клеток, но он концентрируется гранулярными структурами в цитоплазме (рис. 56). Распределение этих плотных гранул соответствует распределению вторичных лизосом, как показано методами световой и электронно-микроскопической цитохимии. Реакционные продукты в случае арилсульфатазы,  $\beta$ -глюкуронидазы, кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы также локализуются внутри гранулярных структур, характеризующихся аналогичной плотностью и распределением.

Технические сложности не позволили объединить иммуноцитохимию с электронной микроскопией. Однако удалось показать, что данные электронно-микроскопической авторадиографии позволяют выделить три типа внутриклеточных органоелл, которые специфически метятся в значимых количествах ( $p < 0,01\%$ ): плазм-

малемму, субплазмалеммальные везикулы и МВГ. Поправка на фон и на процент общего объема клетки, занимаемый каждой системой органелл, приводит к выводу, что никакие другие элементы внутри клеток в экспериментальных условиях не метятся. Относительное число серебряных гранул во всех трех структурах претерпевает, однако, временные изменения [14]. На 10-й минуте практически все гранулы локализируются на плазматической мембране. К 90-й минуте плазмалемма содержит 65% общего числа серебряных гранул, субплазмалеммальные везикулы — 15% и лизосомы — 20%. К 270-й минуте плазмалемма содержит 75% метки, а лизосомы — 25%, тогда как меченные покрытые везикулы становятся незначительным (рис. 58). При иммуноцитохимических исследованиях, проведенных на тканях, обработанных большими дозами НИ-ЛН, выявляется та же локализация, которая была получена и при использовании ХГТ: однако на клеточной поверхности и внутри плотных внутриклеточных гранул в этом случае меченные обеих структур наблюдаются одновременно.

При введении  $^{125}\text{I}$ -ХГТ захват радиоактивности тканью желтого тела составлял 1—3% от введенной, тогда как в контрольных экспериментах при введении свободного радиоактивного йода или  $^{125}\text{I}$ -БСА захват радиоактивности составлял менее 0,01%. В экспериментах *in vivo* предварительное введение ЛГ предотвращало захват  $^{125}\text{I}$ -ХГТ. Желтое тело из яичника, находящегося с противоположной стороны от места введения препарата, во всех случаях содержало менее 1% от количества радиоактивности, обнаруживаемой в желтом теле на стороне введения препарата. Таким образом, захват  $^{125}\text{I}$ -ХГТ из крови становился минимальным уже после первого прохождения препарата в кровотоке через яичник, что объясняется, по-видимому, 4000-кратным разбавлением  $^{125}\text{I}$ -ХГТ в общей системе циркуляции.

В более длительных экспериментах время полувыведения радиоактивного материала из клеток составляло около 14 ч. Было интересно выяснить, такое количество связанного с рецептором гормона диссоциирует в intactном состоянии по сравнению с количеством гормона, который интернализуется и, вероятно, разрушается в лизосомах. Для ответа на этот вопрос был поставлен эксперимент, в котором крупные клетки инкубировали с  $^{125}\text{I}$ -ХГТ в течение 3 ч, промывали и затем инкубировали в отсутствие гормона в течение 14 ч, отбирая пробы через равные промежутки времени (через 3½, 7, 10½ и 14 ч). При истечении 14 ч в супернатанте появилось 50% общего количества радиоактивного материала. В каждый из четырех переходов 65% радиоактивного материала, выходящего с колонки с сефадексом G-25, представляло собой белок, тогда как оставшая радиоактивность принадлежала либо свободному йоду, либо другим низкомолекулярным веществам типа монойодтирозина. Около 80% радиоактивности, ассоциированной с белковой фракцией, было способно вновь связываться с избытком мембранной фракции или осаждалось под действием антител. Таким образом, полученные данные указывают, что примерно

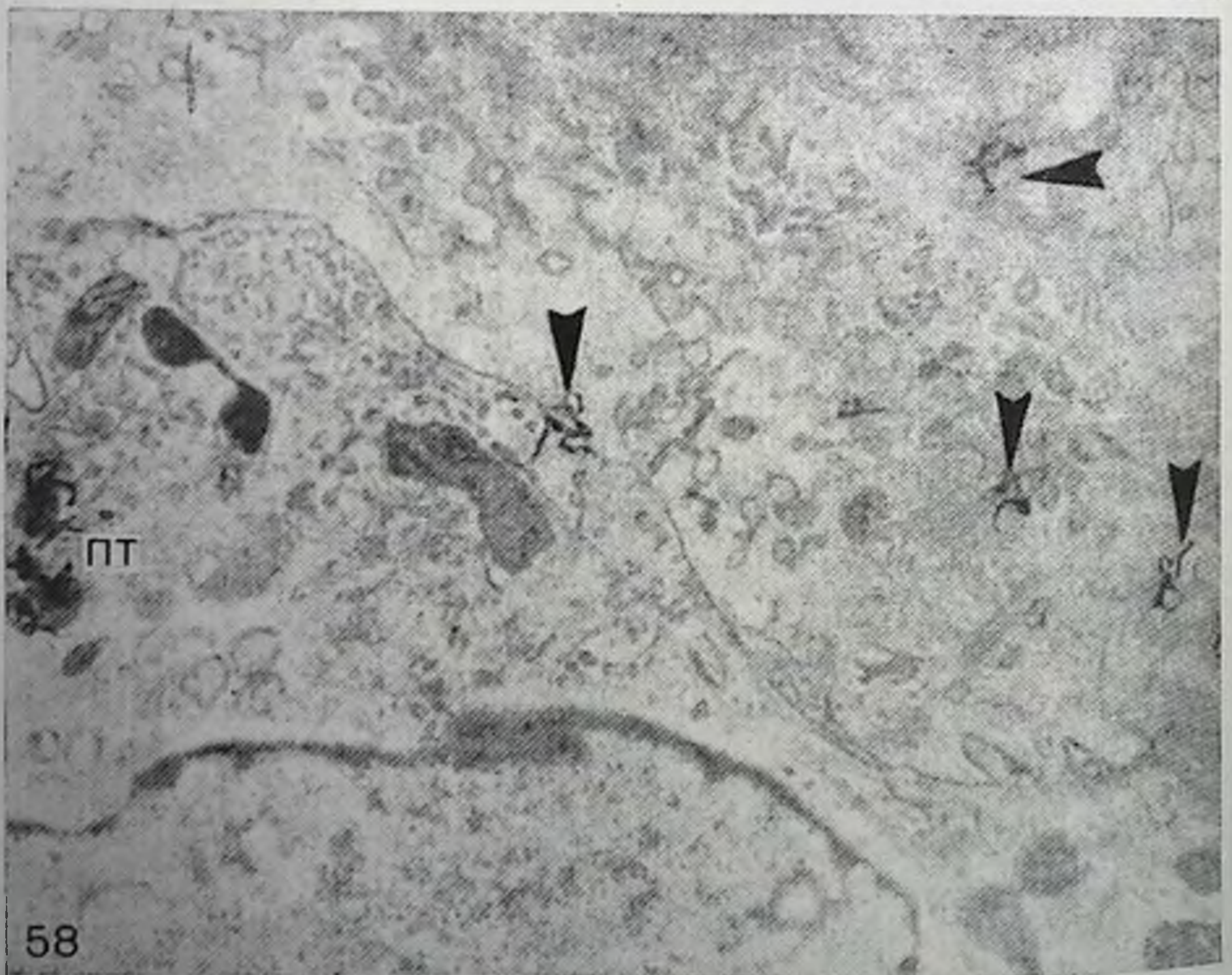
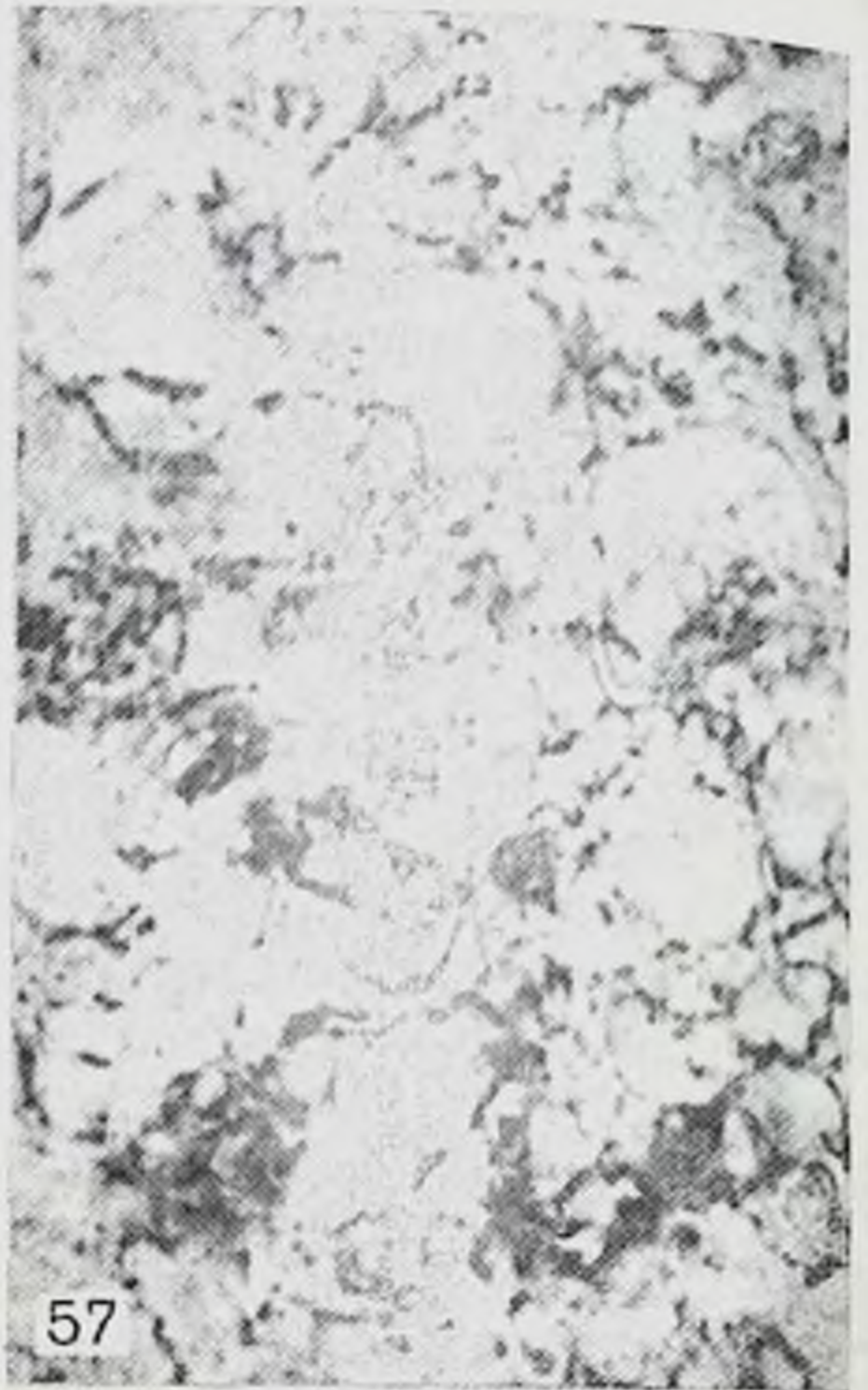
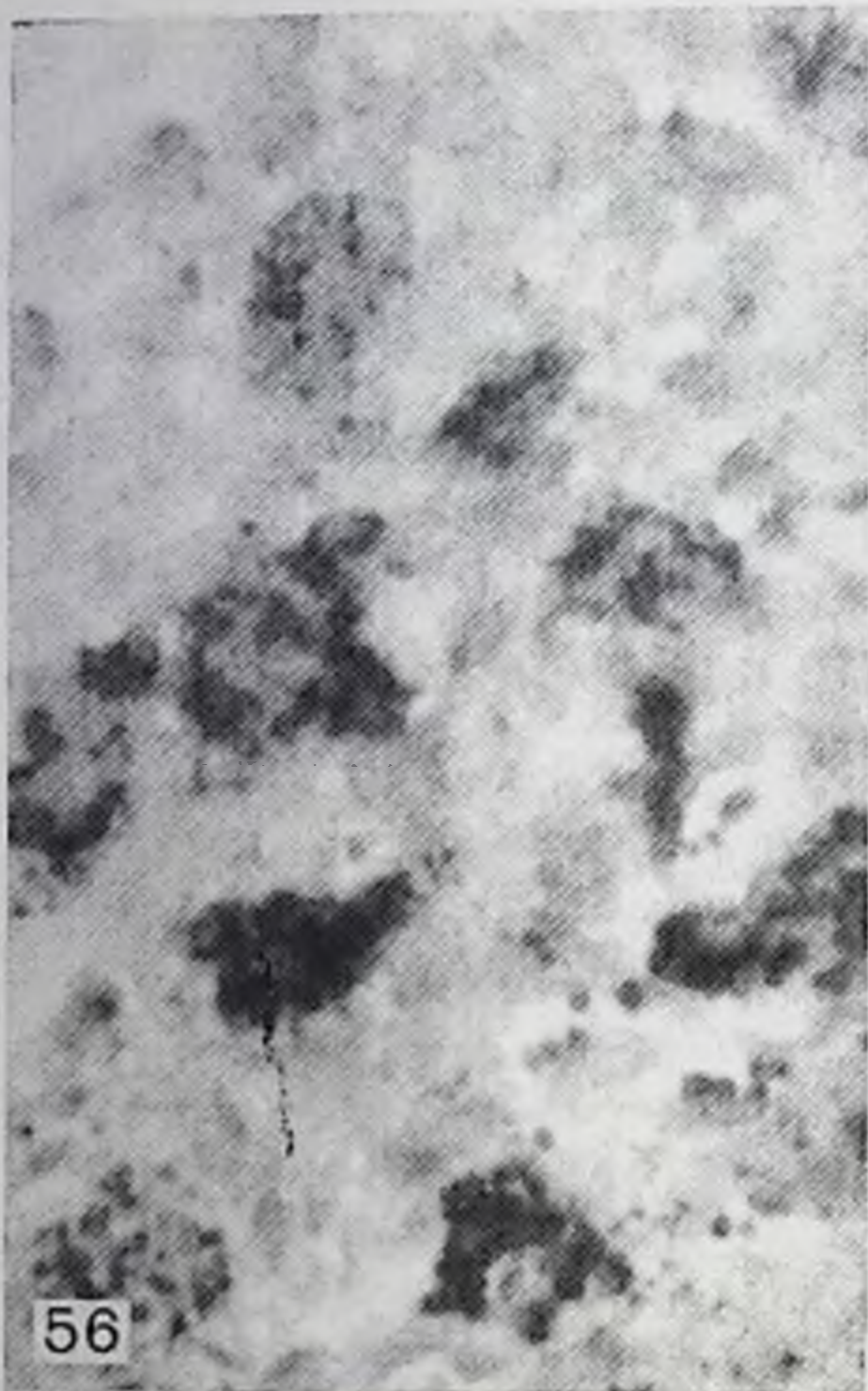


Рис. 56. Через 270 мин после введения  $^{125}\text{I}$ -ХТГ продукт иммуоцитохимической реакции распределен в основном внутри зернистых структур крупных клеток желтого тела. Ув. 450.



25% общего количества радиоактивно меченного белка, первоначально связанного с клетками, диссоциирует и сохраняет при этом достаточно стереохимической специфичности для повторного связывания с очищенными мембранами.

Таким образом, установлено, что заметная часть гормона, связанного с клетками, медленно разрушается. Наиболее вероятно это происходит с участием системы покрытые углубления — лизосомы для этого типа клеток. Связывание гормона представляется достаточно прочным, а превращение плазматической мембраны является достаточно медленным процессом со временем полупревращения около 14 ч. Из того незначительного количества информации, которое удалось получить при использовании ЛГ, следует, что этот гормон также захватывается клетками по механизму эндоцитоза и постепенно оказывается в лизосомах. Поскольку сродство ХГТ к рецептору примерно в 2 раза превосходит соответствующее сродство человеческого ЛГ или ЛГ овец, возможно, что интернализированным оказывается меньшая доля ЛГ, чем ХГТ. Лишь дальнейшее изучение проблемы позволит получить точную информацию об относительной важности диссоциации гормона в яичнике по сравнению с его разрушением.

### Взаимосвязь между МВТ, кислым гидролизом и связыванием гонадотропина

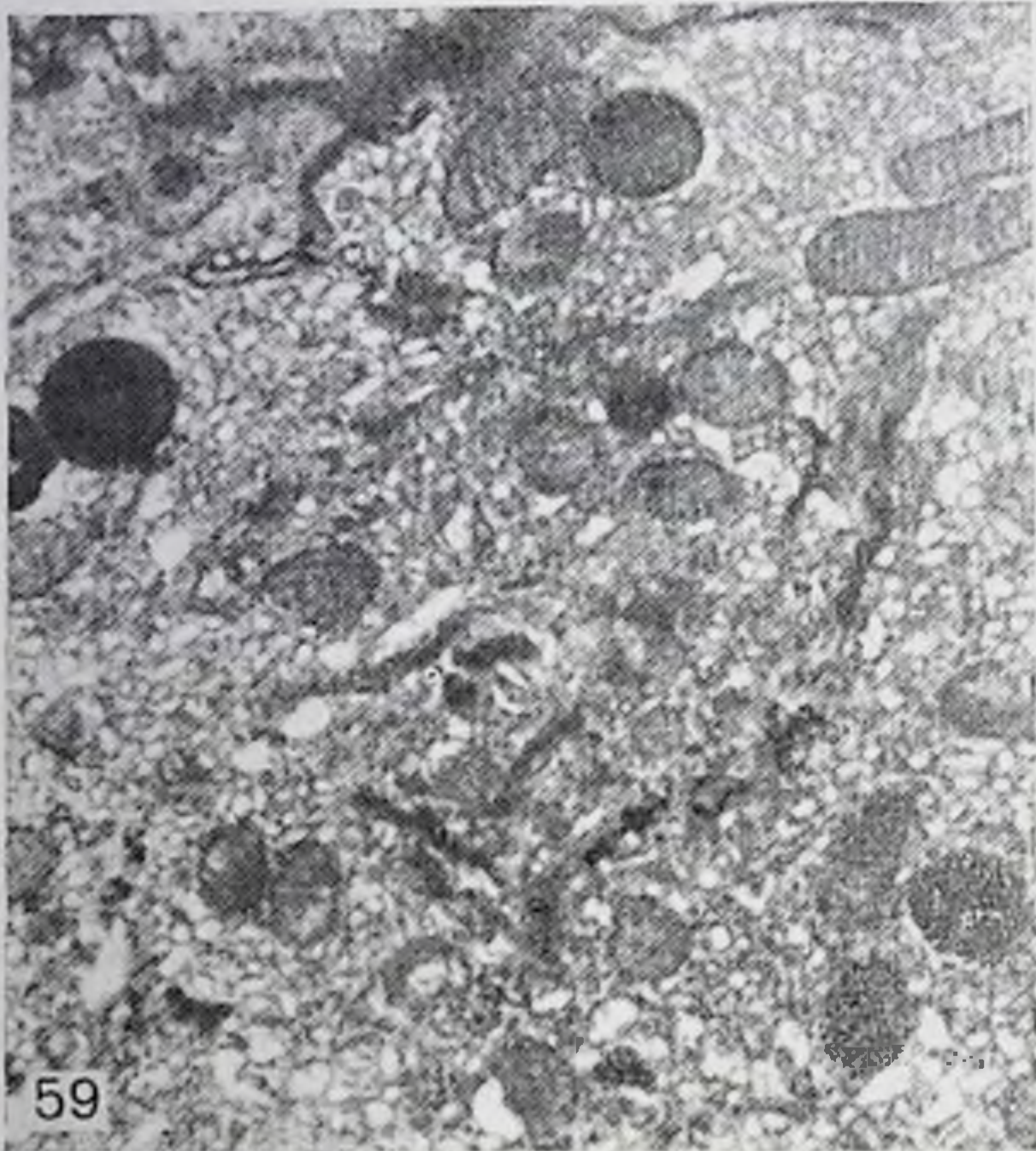
Если справедлива гипотеза, что МВТ отвечают за разрушение комплекса гормон — рецептор, то они должны обладать широким набором кислых гидролаз. Цитохимическое определение ферментов с помощью световой микроскопии показало, что зернистые клетки желтого тела обладают выраженной популяцией внутриклеточных гранул, дающих положительные цитохимические реакции на кислую фосфатазу, арилсульфатазу,  $\beta$ -глюкуронидазу и неспецифическую эстеразу. Кроме того, ультраструктурный цитохимический анализ изменений распределения кислой фосфатазы по мере протекания эстрального цикла показал, что большинство этих гранул представляет собой МВТ. Таким образом, МВТ действительно содержат ферменты, способные разрушать разнообразные макромолекулы. Однако прямое доказательство наличия процесса разрушения гормона в этом компартменте пока отсутствует.

В нескольких работах описана быстрая потеря связывания гонадотропина в зернистых клетках желтого тела вслед за наступ-

←

Рис. 57. Реакционный продукт иммуноцитохимической реакции на ХГТ рас-  
пределяется по периметру крупных и мелких клеток желтого тела. Ув. 450;  
снимок сделан через 30 мин после инъекции ХГТ.

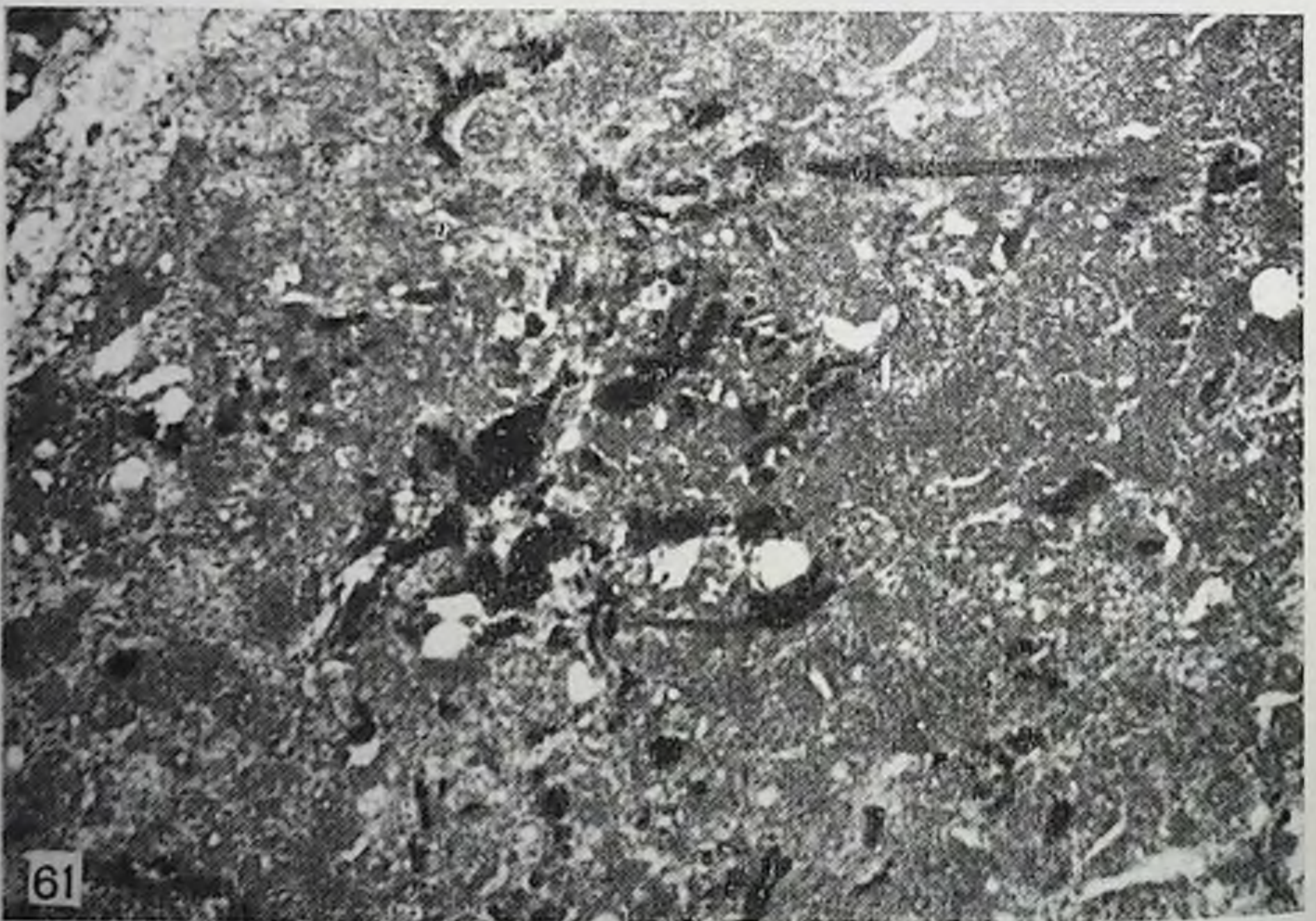
Рис. 58. Авторадиография ткани желтого тела через 90 мин после инъекции  
 $^{125}\text{I}$ -ХГТ. Гранулы серебра локализованы в плазмалемме (показаны стрел-  
ками) и электронно-плотных телах (ПТ). Углубления с покрытием наблю-  
даются вдоль клеточной поверхности в непосредственной близости от гра-  
нул серебра и ПТ. Ув. 12 000, 80 кВ.



59



60



61

Рис. 59. Часть зернистой клетки желтого тела овцы, зафиксированной в состоянии нормальной регрессии. Продукт реакции на кислую фосфатазу локализован в полости Гольджи, маленьких везикулах, расположенных по периметру этой полости, и в МВО. Ув. 21 000, 80 кВ.

Рис. 60. Небольшие участки зернистых клеток желтого тела, выделенных через 6 ч после введения  $PGF_{2\alpha}$  и подвергнутых реакции на кислую фосфатазу. Реакционный продукт локализован в МВО. Ув. 30 000, 70 кВ.

лением нормальной или индуцированной простагландином регрессии [7—9, 25, 26, 29, 32, 33]. Таким образом, если МВТ отвечают за разрушение гормона, то объяснением указанных фактов может быть или наступление некоторых заметных изменений в активности гидролитических ферментов или изменение числа самих МВТ при наступлении регрессии. И действительно, наблюдается очень быстрое и резкое увеличение образования плотных тел (см. рис. 59, 61), активности кислой фосфатазы и числа покрытых углублений на плазматической мембране, коррелирующее с наступлением нормальной или индуцированной регрессии [34].

В фазе цикла, отвечающей промежуточному развитию желтого тела, кислая фосфатаза распределена в структурах, относящихся к аппарату Гольджи, в мелких первичных лизосомах, ассоциированных с периферическими участками клеток, в которых локализован аппарат Гольджи, в мелких гомогенных сферических плотных телах, находящихся в центральной области клетки, и в МВТ, расположенных по периметру клетки (рис. 59). Вслед за наступлением нормальной или индуцированной регрессии наблюдается резкое возрастание числа первичных лизосом, ассоциированных с участками клеток, в которых локализован аппарат Гольджи, числа гомогенных плотных тел и МВТ внутри клеток и числа участков клеток, в которых локализован аппарат Гольджи, обнаруживающих положительную реакцию на кислую фосфатазу (рис. 60 и 61). Кроме того, реакционный продукт локализуется также в двух или трех наиболее удаленных полостях зрелых элементов аппарата Гольджи. Представляется, что появление новых плотных тел происходит по двум четким механизмам: согласованному слиянию первичных лизосом в непосредственной близости от элементов аппарата Гольджи и прямому слиянию с терминалами этого аппарата Гольджи [34]. В непосредственной близости к элементам аппарата Гольджи МВТ не обнаруживаются, тогда как гомогенные плотные тела имеются. Эти наблюдения привели нас к выводу, что МВТ, по-видимому, постепенно аккумулируют входящие в них везикулы по мере удаления от места своего образования. Тот факт, что МВТ, находящиеся ближе к центру клетки, как правило, содержат меньшее число везикул, чем МВТ, расположенные по периметру клетки, поддерживает это положение. И, наконец, на базальной поверхности клеток наблюдается повышенное количество покрытых углублений и везикул. Таким образом, быстрая потеря рецепторов гормонов и наступление регрессии сопровождаются быстрой пролиферацией первичного лизосомального компартмента клеток. Эти данные вполне согласуются с гипотезой об участии МВТ в метаболизме тропиновых гормонов.

←

Рис. 61. То же, что и на рис. 60, но реакционный продукт дополнительно обнаруживается в части клетки, в которой расположен комплекс Гольджи, и в маленьких однородных электронно-плотных образованиях. Ув. 16 800.

## Гипотетический механизм регенерации рецепторов

Если гормон-рецепторные комплексы в действительности постоянно поглощаются и разрушаются в клетке на протяжении 2-недельного функционального существования, то должен существовать и некий согласованный механизм замены старых рецепторов на новые по мере исчезновения первых. У нас нет прямых доказательств наличия такого процесса, но мы предполагаем их получить. В ранее опубликованных работах мы показали, что два типа структур, образующихся на уровне аппарата Гольджи, внедряют ограничивающие их мембраны в плазмалемму [2, 3, 35, 43—45]. Эти два типа структур представляют собой маленькие покрытые везикулы (размером 800—1000 нм), возникающие на уровне аппарата Гольджи в процессе фазы логарифмического преовуляторного роста, и секреторные гранулы в лютеальной фазе цикла.

В ранней стадии развития желтого тела, непосредственно за резким подъемом ЛГ, но до начала овуляции, в зернистых клетках инициируется логарифмическая фаза роста. Этот рост характеризуется быстрой пролиферацией структур Гольджи, митохондрий и др., но не лютеинизацией. Лютеинизацию мы рассматривали [4] как момент, с которого зернистые клетки дифференцируют компоненты, требуемые для синтеза прогестерона, включая трубочки агранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрии с трубчатовезикулярными полостями и ферменты, необходимые для синтеза стероидных гормонов. Расширение аппарата Гольджи характеризуется пролиферацией множества более мелких его элементов, по периферии которых располагаются ассоциированные мелкие покрытые везикулы. Этому сопутствует появление многочисленных покрытых везикул и покрытых углублений вдоль базальной границы клеток. Другими словами, представляется, что в клетках происходит или формирование новых плазматических мембран или обновление старых. Поскольку клетки растут с логарифмической скоростью, формирование новых мембран представляется более вероятным.

Для проверки этого предположения *in vivo* суперовулированным овцам непосредственно перед овуляцией в питающую яичники артерию вводили меченую тритием фукозу, представляющую собой важный компонент гликокаликса на плазматической мембране, после чего через определенные интервалы времени удаляли желтое тело. Результаты электроно-микроскопической автордиографии показали, что первичная волна серебряных зерен распространяется изнутри к периметру аппарата Гольджи, где в большом количестве имеются покрытые везикулы, а затем к плазматической мембране, на которой зерна и удерживаются до конца эксперимента через 16 ч [2]. Следовательно, мелкие покрытые везикулы, которые встречаются повсеместно после подъема содержания ЛГ, по-видимому, хотя бы частично участвуют в происходящей в это время пролиферации плазматической мембраны.

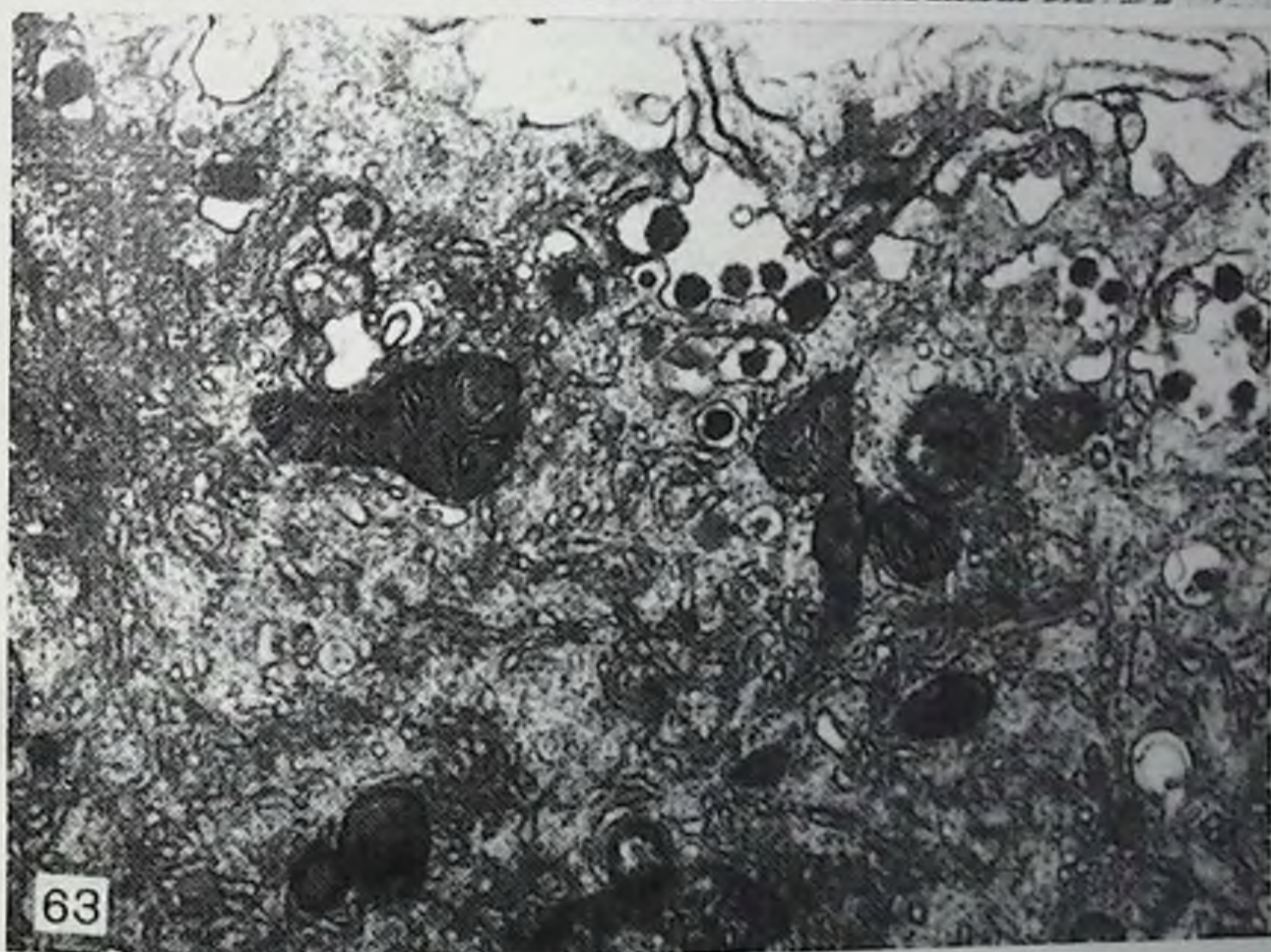


Рис. 62. Часть зернистой клетки желтого тела, в которой расположен комплекс Гольджи, выделенной и зафиксированной в промежуточном этапе развития желтого тела. Секреторные гранулы распределены по всему участку и тесно ассоциированы с элементами аппарата Гольджи. Ув. 18 000, 80 кВ.

Рис. 63. Содержимое секреторных гранул присутствует в углублениях с покрытием и канальцах по базальной поверхности клетки желтого тела. Мембраны различных гранул начинают сливаться друг с другом и с плазмалеммой. Ув. 14 400 раз, 80 кВ.

Вслед за овуляцией и завершением образования желтого тела покрытые везикулы, ассоциированные с элементами аппарата Гольджи по их периметру, становятся менее заметны. Одновременно с их исчезновением аппарат вовлекается в образование большого количества больших связанных с мембранами секреторных гранул (рис. 62). Образование и секреция этих гранул (рис. 63), как было показано [20, 21, 43—45], регулируются стимуляцией клеток гонадотропинами (ЛГ и ХГТ) и тесно коррелируют с синтезом и высвобождением прогестерона. Эти данные указывают на то, что названные гранулы могут содержать белок-переносчик, участвующий в секреции прогестерона. Кроме того, мы полагаем, что мембраны, окружающие эти гранулы, также могут содержать новые рецепторы гормонов. Предварительные данные, полученные при экспериментах с использованием меченных тритием фукозы и аминокислот, показали, что мембраны секреторных гранул включены в базальную поверхность клетки и обновляются с очень малой скоростью. В дополнение к этому частично очищенные препараты секреторных гранул демонстрируют высокую аффинность в связывании гонадотропинов. Таким образом, зернистые клетки желтого тела могут обладать внутренним механизмом, объединяющим поглощение и разрушение рецепторов и образование новых рецепторов. Как известно, факторы, повышающие скорость эндцитоза в этих клетках, ЛГ, ХГТ и кальций [43—45] одновременно стимулируют образование секреторных гранул и высвобождение из клеток прогестерона.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во многих работах показано, что гонадотропины, по-видимому, первоначально связываются с плазматическими мембранами яичника млекопитающих [13, 17, 22, 23, 27, 32, 38, 39, 42]. Результаты, представленные в настоящем разделе, показывают дополнительно, что соответствующие рецепторы в значительной мере принадлежат той части плазмалеммы, которая обращена в перикапиллярное пространство. Связывание гормонов отличается прочностью и происходит период полураспада 14—16 ч. Лишь небольшая часть гормона, связанного с крупными клетками желтого тела в условиях *in vitro*, действительно претерпевает диссоциацию с сохранением способности повторно связаться с рецептором. Основная часть, по-видимому, претерпевает в клетках разрушение до более мелких молекул. Полученные данные показывают, что по меньшей мере часть связанного гормона проникает в клетку в покрытых везикулах, которые в свою очередь сливаются с лизосомами. Лизосомы содержат большой набор гидролитических ферментов, способных разрушать различные макромолекулы. Таким образом, представленные данные поддерживают идею о том, что хотя бы часть гонадотропинов, связавшихся с высокоаффинными рецепторами зернистых клеток желтого тела, захватывается клетками и разрушается внутри них (рис. 64). Относительную важ-

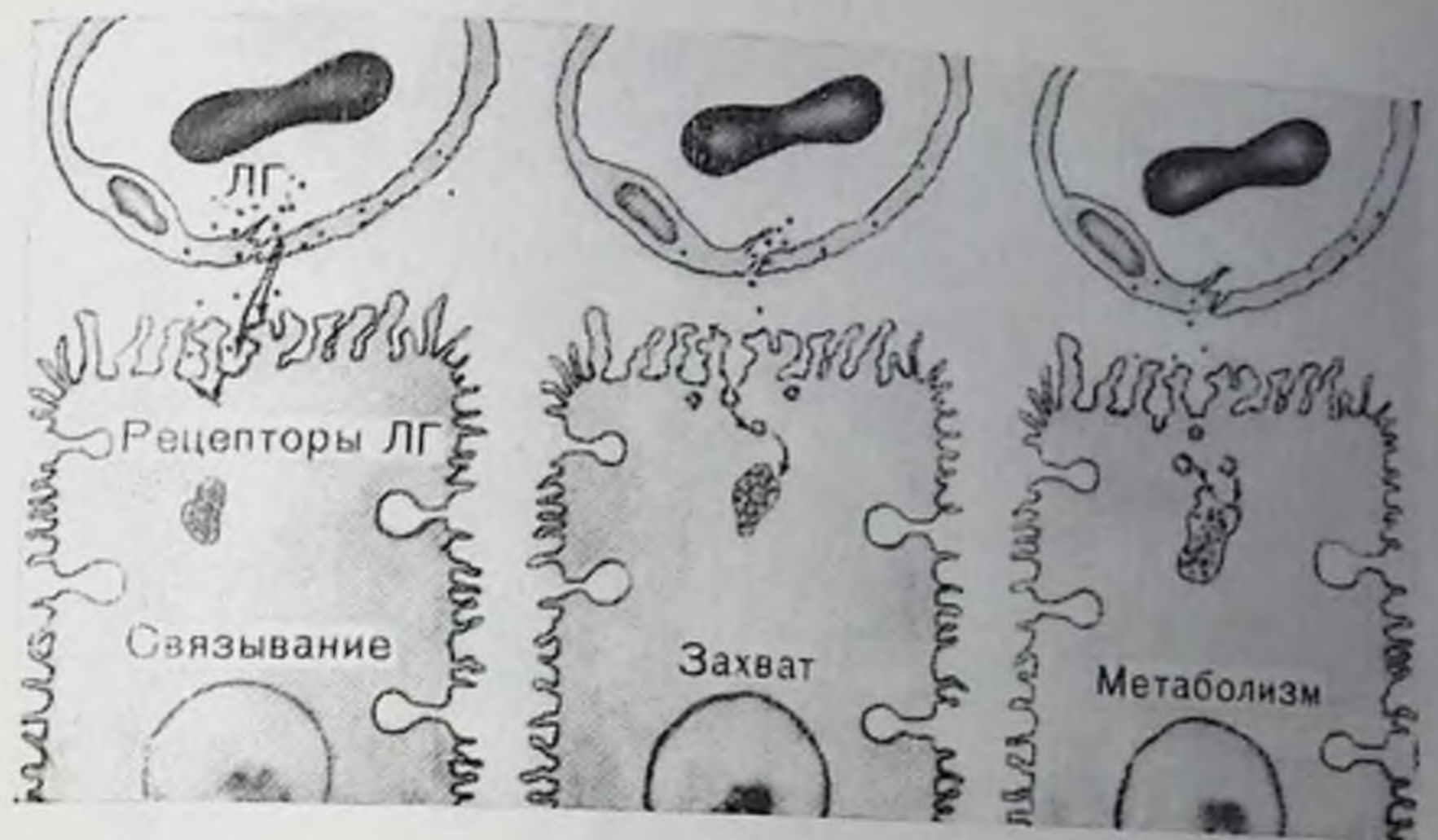


Рис. 64. Схематическое изображение предлагаемой гипотезы связывания и метаболизма трофических гормонов в яичнике. Первоначально гормон связывается с рецепторами, расположенными на неровной базальной поверхности клетки. Далее комплекс гормон — рецептор медленно и постепенно переходит в углубления с покрытием, а затем и в покрытые везикулы. После этого покрытые везикулы захватываются лизосомами, где гормон претерпевает разрушение, которое может быть полным или частичным.

ность процессов диссоциации и разрушения гормонов еще предстоит выяснить.

Концепция, что пептидные гормоны, связанные со специфическими рецепторами, захватываются и разрушаются в клетках системы покрытые углубления — лизосомы, не является полностью оригинальной. Во многих классических исследованиях показано, что эта система важна для транспорта питательных веществ внутрь различных клеток [5, 18, 19, 31, 40, 41, 52]. Кроме того, эта система является основной, используемой клетками ретикулоэндотелиальной системы для удаления посторонних веществ и разрушенных клеток [15, 16, 48, 49]. Во всех случаях существует высокая степень специфичности между клетками-мишенями и адсорбируемыми макромолекулами. Имеется также несколько хороших примеров того, что и другие пептидные гормоны адсорбируются и разрушаются сходным образом. Было показано, что  $^{125}\text{I}$ -инсулин, связанный с высокоаффинными рецепторами крысиных гепатоцитов, захватывается эндцитотическими везикулами, включается в лизосомы и разлагается до составляющих его аминокислот [50]. Подобным же образом меченый  $^{125}\text{I}$  фактор роста эпидермиса человека захватывается и метаболизируется в лизосомальном компартменте фибробластов [12]. Хотя нам не удалось прямо показать, что лизосомы яичников ответственны за деградацию ХГТ, полученные результаты свидетельствуют о такой возможности. Следовательно, ряд клеток, обладающих высокоаффинными рецепторами для специфических пептидных гормонов, способен метаболизировать эти гормоны внутри ткани-мишени.

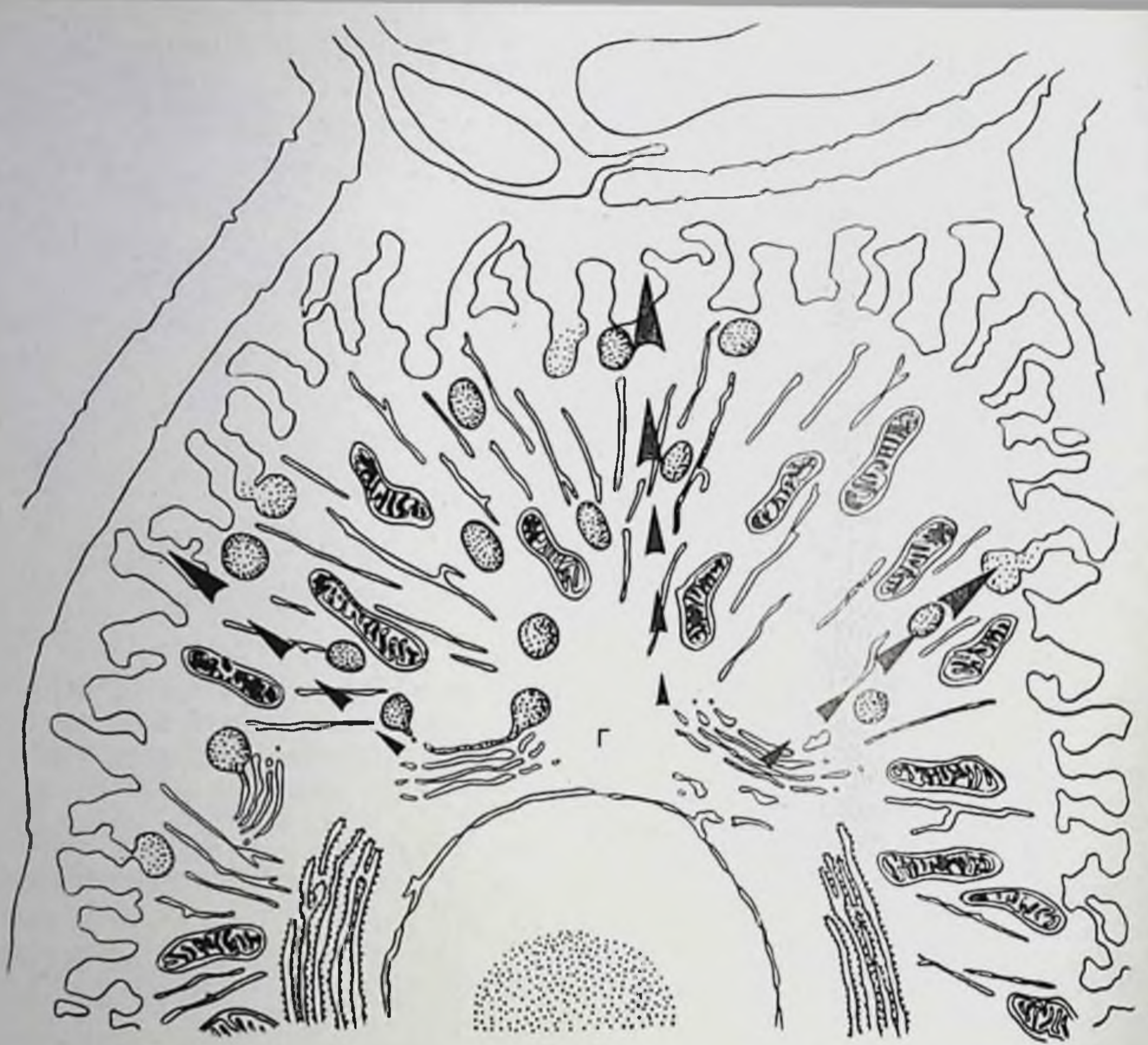


Рис. 65. Схема процесса, участвующего в регенерации плазмалеммы.

В процессе промежуточной фазы цикла зернистые клетки желтого тела в результате стимулирующего действия гонадотропинов генерируют крупные связанные с мембранами секреторные гранулы на уровне комплекса Гольджи (Г). Эти гранулы перемещаются к базальной поверхности клетки, где их содержимое высвобождается (отмечено стрелками). Эксперименты с мечеными изотопами предшественниками плазмалеммы показывают, что по меньшей мере часть мембраны гранулы проникает в процессе разрушения гранул в плазматическую мембрану, где и остается в течение нескольких часов. Мы полагаем, хотя и не имеем точных доказательств этого, что подобным же способом в плазматическую мембрану вводятся новые рецепторы гормонов.

Была высказана гипотеза, что мембраны секреторных гранул представляют собой внутриклеточную структуру, ответственную за введение новых рецепторов гормонов в плазмалемму (рис. 65). Свидетельства в пользу этой гипотезы включают: а) факт встраивания радиоактивно меченных предшественников плазмалеммы при введении в клетки желтого тела в мембраны этих гранул и затем в плазматическую мембрану, где они на некоторое время задерживаются; б) одновременную активацию под действием гонадотропинов эндоцитоза и экзоцитоза, что указывает на сопряженность процессов захвата мембраны и ее обновления; в) отсутствие каких-либо других наблюдаемых структур, внедренных в плазмалемму, за исключением мембран гранул в процессе проме-



жуточной фазы формирования желтого тела. Однако все эти данные носят предварительный характер и реальную значимость этой гипотезы еще предстоит оценить.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abel J. H., Jr., Chen T. T., Diekman M. A., McClellan M. C., Sawyer H. R., Vigil E. L., Niswender G. D.* A possible role for endocytosis and lysosomes in the metabolism of tropic hormones in the ovary.—*J. Histochem. Cytochem.*, 1977, 26, 3.
2. *Abel J. H., Jr., McClellan M. C., Chen T. T., Sawyer H. R., Niswender G. D.* Subcellular compartmentalization of ovarian granulosa-luteal cell function. — *J. Cell Biol.*, 1976, 79, 367.
3. *Abel J. H., Jr., McClellan M. C., Verhage H. G., Niswender G. D.* Subcellular compartmentalization of the luteal cell in the ovary of the dog. — *Cell Tissue Res.*, 1975, 158, 461.
4. *Abel J. H., Jr., Verhage H. G., McClellan M. C., Niswender G. D.* Ultrastructural analysis of the granulosa-luteal cell transition in the ovary of the dog. — *Cell Tissue Res.*, 1975, 160, 155.
5. *Anderson R. G. W., Brown M. S., Goldstein J. L.* Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. — *Cell*, 1977, 10, 351.
6. *Barrett A. J.* Lysosomal enzymes. — In: *Lysosomes, A Laboratory Handbook*, ed. by Dingle. 1972, p. 46. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
7. *Behrman H. R., Hichens M.* Rapid block of gonadotropin uptake by corpora lutea in vitro induced by prostaglandin F<sub>2α</sub>. — *Prostaglandins*, 1976, 12, 83.
8. *Behrman H. R., Ng T. S., Orczyk G. P.* Interactions between prostaglandins and gonadotrophins corpus luteum function. — In: *Advances in chemistry, Biology and Immunology of Gonadotrophins*, ed. by C. H. Li, N. R. Mondgal, 1974, Academic Press, London.
9. *Behrman H. R., Yoshinaga K., Greep R. O.* Extraluteal effects of prostaglandins. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1971, 180, 426.
10. *Brunk U. T., Ericsson J. L.* The demonstration of acid phosphatase in in vitro cultured tissue cells. Studies on the significance of fixation, tonicity and permeability. — *Histochem. J.*, 1972, 4, 349.
11. *Burstone M. S.* A naphthal AS-D acetate method for esterase. — In: *Enzyme Histochemistry*, Academic Press, New York, 1962.
12. *Carpenter G., Cohen S.* <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor: Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. — *J. Cell Biol.*, 1976, 71, 159.
13. *Catt K. J., Dufau M. L.* Basic concepts of the mechanism of action of peptide hormones. — *Biol. Reprod.*, 1976, 14, 1.
14. *Chen T. T., Abel J. H., Jr., McClellan M. C., Sawyer H. R., Diekman M. A., Niswender G. D.* Localization of gonadotropic hormones in lysosomes of ovine luteal cells. — *Cytobiologie*, 1977, 14, 412.
15. *Cohn Z. A.* The requirements and consequences of pinocytosis in mouse macrophages. — In: *Cellular Recognition*, ed. by R. T. Smith, R. A. Good, 1969, p. 39. Appleton-Century-Crofts, New York.
16. *Cohn Z. A.* Lysosome in mononuclear phagocytes. — In: *Mononuclear Phagocytes*, ed. by R. Van Farth, 1970. F. A. Davis Company, Philadelphia.
17. *Cuatrecasas P., Hollenberg M. D., Chang K. J., Bennett V.* Hormone receptor complexes and their modulation of membrane function. — *Recent Prog. Horm. Res.*, 1975, 31, 37.
18. *Fawcett D. W.* Surface specializations of absorbing cells. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1965, 13, 75.
19. *Friend D. S., Farquhar M. G.* Functions of coated vesicles during proetin absorption in the rat vas deferens. — *J. Cell Biol.*, 1967, 35, 357.

20. *Gemmell R. T., Stacy B. D.* Effect of colchicine on the ovine corpus luteum: Role of microtubules in the secretion of progesterone. — *J. Reprod. Fertil.*, 1977, 49, 115.
21. *Gemmell R. T., Stacy B. D., Thorburn G. D.* Ultrastructural study of secretory granules in the corpus luteum of the sheep during the estrous cycle. — *Biol. Reprod.*, 1974, 11, 447.
22. *Gospodarowicz D.* Properties of luteinizing hormone receptor of isolated corpus luteum plasma membrane. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 5042.
23. *Gospodarowicz D.* Preparation and characterization of plasma membrane for bovine corpus luteum. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 5050.
24. *Graham R. C., Karnovsky J. J.* The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1966, 14, 291.
25. *Grinwich D. L., Hichens M., Behrman H. R.* Control of the LH receptor by prolactin and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in rat corpora lutea. — *Biol. Reprod.*, 1976, 14, 212.
26. *Grinwich D. L., Ham E. A., Hichens M., Behrman H. R.* Binding of human chorionic gonadotropin and response of cyclic nucleotides to luteinizing hormone in luteal tissue from rats treated with prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . — *Endocrinology*, 1976, 98, 146.
27. *Han S. S., Rajaniemi H. J., Cho J. I., Hirshfield A. N., Midgley A. R., Jr.* Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. Subcellular localization of LH binding sites by electron microscopic radioautography. — *Endocrinology*, 1974, 95, 589.
28. *Hayashi M.* Cytochemical localization of  $\beta$ -glucuronidase. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1967, 15, 83.
29. *Hichens M., Grinnich D. J., Behrman H. R.*  $PGF_{2\alpha}$ -induced loss of corpus luteum gonadotropin receptors. — *Prostaglandins*, 1974, 7, 449.
30. *Karnovsky M. J.* A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. — *J. Cell Biol.*, 1965, 27, 1374.
31. *Korn E. D.* Biochemistry of endocytosis. — In: *MTP International Review of Science*, 2, ed. by C. F. Fox, 1975, p. 1. Butterworths, London.
32. *Lee C. Y., Ryan R. J.* Interaction of ovarian receptors with human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. — *Biochemistry*, 1973, 12, 4609.
33. *Lee C. Y., Tateishi K., Ryan R. J., Jiang N. S.* Binding of human chorionic gonadotropin by rat ovarian slices. Dependence on the functional state of the ovary. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1975, 148, 505.
34. *McClellan M. C., Abel J. H., Jr., Niswender G. D.* Function of lysosomes during luteal regression in normally cycling and  $PGF_{2\alpha}$ -treated ewes. — *Biol. Reprod.*, 1977, 16, 499.
35. *McClellan M. C., Diekman M. A., Abel J. H., Jr., Niswender G. D.* Interrelationships between luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep. — *Cell Tissue Res.*, 1976, 164, 291.
36. *Niswender G. D.* Influence of the site of conjugation on the specificity of antibodies to progesterone. — *Steroids*, 1973, 22, 413.
37. *Phillips D. R., Morrison M.* Exposed protein on the intact human erythrocyte. — *Biochemistry*, 1971, 10, 1766.
38. *Rao Ch. V., Saxena B. B.* Gonadotropin receptors in the plasma membrane of rat luteal cells. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 313, 372.
39. *Roth J.* Peptide hormone binding to receptors: A review of direct studies in vitro. — *Metabolism*, 1973, 22, 1039.
40. *Roth T. F., Cutting J. A., Atlas S. B.* Proetin transport: A selective membrane mechanism. — *J. Supramol. Struct.*, 1976, 4, 527.
41. *Roth T. F., Porter K. R.* Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. — *L. J. Cell Biol.*, 1964, 20, 313.
42. *Ryan R. J., Dufan M. L.* Basic concepts of the mechanism of action of peptide hormones. — *Biol. Reprod.*, 1976, 14, 16.

43. Sawyer H. R., Abel J. H., Jr., McClellan M. C., Chen T. T. Mechanism of progesterone secretion from ovine corpora lutea in vitro. — *Biol. Reprod.*, 1977, 17, 20.
44. Sawyer H. R., Abel J. H., Jr., McClellan M. C., Schmidt M., Niswender G. D. Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea in vitro. — *Endocrinology*, 1977 (in press).
45. Sawyer H. R., McClellan M. C., Abel J. H., Jr., Chen T. T., Niswender G. D. Cellular mechanisms involved in the packaging and secretion of a secretory product from ovarian granulosa luteal cells. — *Anat. Rec.*, 1977, 187, 706.
46. Sheridan P. J., Phillips J. L., Simmons K. R., Caffrey J. L., Abel J. H., Jr., Niswender G. D. Modulation of the uptake and retention of estradiol-17 $\beta$  in the ovine corpus luteum by luteinizing hormone. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1975, 149, 537.
47. Simmons K. R., Caffrey J. L., Phillips J. L., Abel J. H., Jr., Niswender G. D. A simple method of preparing suspensions of luteal cells. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1975, 142, 366.
48. Steinman R. M., Cohn Z. A. Interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro. — *J. Cell Biol.*, 1972, 55, 180.
49. Steinman R. M., Cohn Z. A. The metabolism and physiology of mononuclear phagocytes. — In: *The Inflammatory Process*, ed. by B. W. Zwerfach, L. Grant, R. T. McClaskey, 1972, p. 357. Academic Press, New York.
50. Ferris S., Steiner D. F. Binding and degradation of <sup>125</sup>I-insulin by rat hepatocytes. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 8389.
51. Wookman H., Hartrodt W. A new technique for the cytochemical localization of aryl sulfatase. — *Histochemie*, 1967, 11, 81.
52. Yusko S. C., Roth T. F. Binding to specific receptors on oocyte plasma membranes by serum phospholipovitellin. — *J. Supramol. Struct.*, 1976, 4, 89.

# РЕЦЕПТОРЫ ЛЕКАРСТВ И ТОКСИНОВ В МЕСТАХ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

## СВЯЗЫВАНИЕ 1-ФТОР-2,4-ДИНИТРОБЕНЗОЛА И НЕКОТОРЫХ СТИЛЬБЕН-2,2'-ДИСУЛЬФОКИСЛОТ С ЦЕНТРАМИ, РЕГУЛИРУЮЩИМИ АНИОННУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ, НА БЕЛКЕ ПОЛОСЫ 3 МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

Х. ПАССОВ (H. PASSOW)

*Институт биофизики имени Макса Планка, 6000 Франкфурт-на-Майне, ФРГ*

### ВВЕДЕНИЕ

В 1974—1975 гг., когда впервые было высказано предположение [2, 5, 9], что белок полосы 3 может участвовать в транспорте анионов через мембрану эритроцита, имевшиеся доказательства этого были сомнительны [6]. За прошедшее время накоплено много данных, которые, взятые в целом, по-видимому, подтверждают исходное предположение [4, 5, 7, 8, 10, 13]. В настоящее время происходит переход от идентификации транспортного белка к попыткам выяснить механизм его действия.

Белок полосы 3 имеет молекулярную массу около 100 000 дальтон и, по-видимому, неоднократно пронизывает липидный бислой [3]. Таким образом, мы имеем дело с молекулой, которая значительно больше по размерам и, по-видимому, гораздо сложнее, чем, например, гемоглобин или рибонуклеаза. Хорошо известно, что даже для этих более простых белков выяснение вопроса о взаимоотношении их структуры и функции потребовало нескольких десятилетий напряженной работы в лабораториях всего мира. Даже в настоящее время периодически продолжают появляться публикации, проливающие свет на молекулярные механизмы функционирования этих белков. Несмотря на огромное количество работ, посвященных белку полосы 3, предстоит сделать еще немало, чтобы понять механизм его действия. Поэтому необходимо сложный вопрос о том, как этот белок производит транспорт анионов, разбить на несколько более мелких вопросов, касающихся самостоятельных аспектов этой общей проблемы.

Настоящий раздел посвящен изучению рецепторных центров для некоторых агентов, ингибирующих транспорт анионов через мембрану эритроцита. Этими агентами являются 1-фтор-2,4-динитробензол (ФДНБ), стильбендисульфокислота (СДСК) и некоторые изотиоцианатные производные этой кислоты — 4-изотиоцианат-4'-ацетамидостильбен-2,2'-дисульфокислота (ИАСК), 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфокислота (ДИСК) и 4,4'-диизотиоцианодигидростильбен-2,2'-дисульфокислота (ДИГСК). Был поставлен следующий вопрос: каким образом стильбендисульфокислоты влияют на связывание ФДНБ и как связывание ФДНБ

влияет на определяемое затем ковалентное и нековалентное связывание стильбендисульфокислот?

Для того чтобы объяснить важность этого вопроса, целесообразно вкратце напомнить два основных эксперимента, которые привели к предположению об участии белка полосы 3 в транспорте анионов.

Чтобы идентифицировать белок, опосредующий транспорт анионов в мембране эритроцита, Cabantchik и Rothstein попытались синтезировать ингибиторы, которые способны ковалентно связываться с транспортирующей системой, но не с другими компонентами мембраны. После первоначальных безуспешных экспериментов с меченой  $^{131}\text{I}$  4,4'-динитроцианодигидростильбен-2,2'-дисульфокислотой ( $\text{I}_2\text{ДИКСК}$ ) в 1972 г. [1] они сумели, наконец, показать в 1974 г., что ДИКСК представляет собой сильный ингибитор, связывающийся почти исключительно с белком полосы 3 [2]. Хотя более поздние эксперименты [6] показали, что существует дополнительное связывание ингибитора с белками, мигрирующими в районе полос от 4,1 до 4,5 (по номенклатуре Steck [12]) и не разделяемыми на соответствующих гелях, полученные данные позволили предположить участие белка полосы 3 в транспорте анионов.

В нашей лаборатории мы использовали косвенный подход, который, однако, имеет более общий характер, поскольку он может быть использован для идентификации центров связывания для любого ковалентно и нековалентно связывающегося ингибитора. Этот подход предусматривает динитрофенилирование с помощью  $^{14}\text{C}$ -ФДНБ в отсутствие и в присутствии второго ингибитора. ФДНБ легко проникает через мембрану эритроцита и взаимодействует с любой группой, включая аминокрупы, которые присутствуют в свободном виде во всех мембранных белках. Если, однако, клетки подвергать динитрофенилированию после предварительной обработки таким ковалентно связывающимся ингибитором, как, например, ИАСК, или в присутствии обратимо связывающегося ингибитора, как, например, 4,4'-диацетамидостильбен-2,2'-дисульфокислота (ДАСК), то обнаружится, что все мембранные белки продолжают метиться ФДНБ, за исключением белка полосы 3. Эти данные показывают, что белок полосы 3 является единственным, имеющим общие центры для нескольких различных ингибиторов анионного транспорта. Хотя нельзя полностью исключить возможность, что небольшое количество общих связывающих центров существует на неидентифицированных, пока еще необнаруженных белках, в 1974 г. мы считали имеющиеся факты достаточными, чтобы предположить участие белка полосы 3 в транспорте анионов [9].

При использовании ИАСК,  $\text{I}_2\text{ДИКСК}$  и ДАСК в сочетании с ФДНБ мы обнаружили, что примерно  $1,0-1,3 \cdot 10^6$  общих связывающих центров на каждой клетке могут быть связаны с транспортом анионов [9, 14]. Эта цифра расходится с ранее определенной [2, 5], когда использовались результаты связывания изотопной

цианата, но подтверждается более поздними экспериментами [4, 11]. Поскольку каждая клетка содержит около  $1 \cdot 10^6$  молекул белка полосы 3 [12], представляется, что связывание одной молекулы ДИГСК, ДАСК или ФДНБ с одной из белковых молекул ведет к полной инактивации молекулы белка как переносчика анионов. Хотя сведения по связыванию ФДНБ или изотиоцианатных производных при полном ингибировании, по-видимому, достаточно надежны, данные о количестве молекул белка полосы 3 в каждой клетке требуют уточнения. Они были получены из данных о полном количестве белка, определенном соответствующим методом и умноженному на фактор, отражающий фракционное связывание кумасси голубого с белком фракции 3. Этот метод не может исключить наличия ошибки в 100% и даже более.

Существуют достаточные основания полагать, что образование ковалентной связи между ФДНБ и центром, контролирующим анионную проницаемость, на белке полосы 3 протекает без стадии предварительного нековалентного связывания [15]. Эта ситуация отличается от наблюдаемой при взаимодействии белка с изотиоцианатами или стильбендисульфокислотами. Было показано [2, 6], что необратимому связыванию ДИСК или ДИГСК предшествует стадия обратимого связывания. Отсюда возникает вопрос, происходит ли обратимое и необратимое связывание по тому же самому или по разным центрам. Для того чтобы дать ответ на этот вопрос и частично охарактеризовать контролирующую анионную проницаемость центры связывания ФДНБ и изотиоцианатов в белке полосы 3, было изучено действие динитрофенилирования на оба типа связывания ДИГСК. Полученные таким образом результаты были дополнены данными о влиянии обратимого связывания СДСК на процесс динитрофенилирования связывающих центров для ДИГСК.

### ОБРАТИМОЕ И НЕОБРАТИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ДИГСК

Когда эритроциты суспендируют в среде, содержащей ДИГСК, происходит связывание агента с поверхностью клеток. Это связывание завершается в течение нескольких минут (иными словами, еще до отбора первого образца), что доказывается отсутствием дальнейших изменений концентрации ДИГСК в среде (рис. 66). Из уменьшения концентрации ДИГСК может быть рассчитано связывание агента с клетками. Таким способом было изучено отношение между существующей в среде концентрацией ДИГСК и его последующим связыванием с клетками после их добавления. Некоторые из полученных результатов приведены на рис. 67, из которого следует, что степень связывания ДИГСК повышается вплоть до максимальных использованных концентраций, при которых с клетки связывается 7—8 млн. молекул ДИГСК. В изученном интервале тенденция к насыщению не обнаруживается; кроме того, она не зависит от времени в течение по крайней мере 90 мин. Разграничить обратимое и необратимое связывание

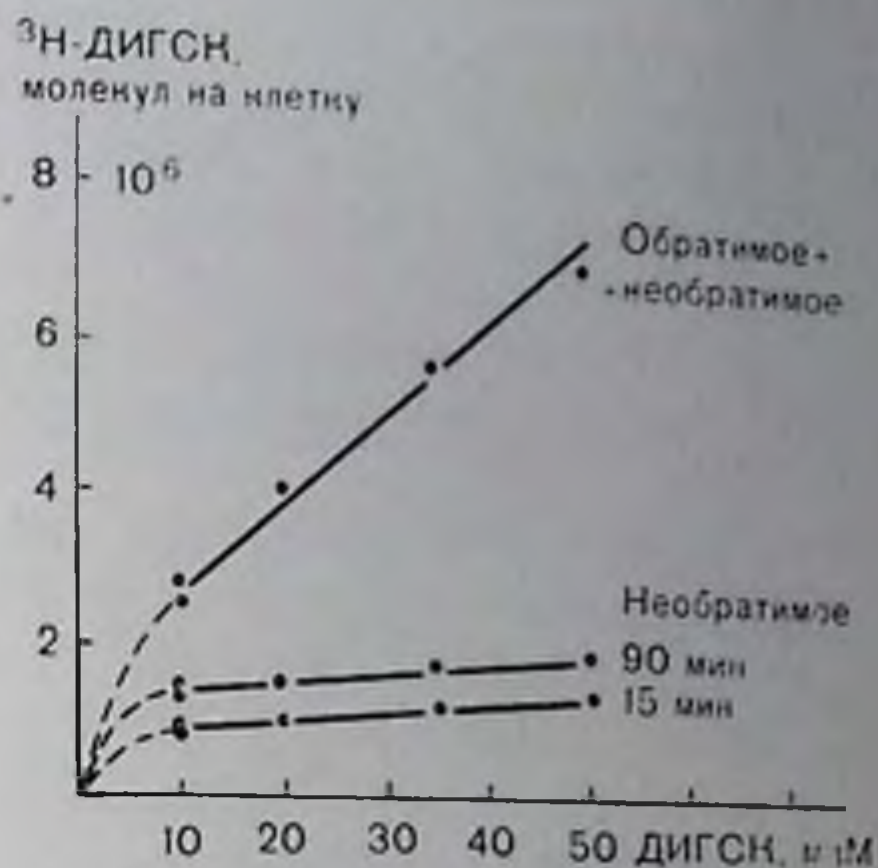
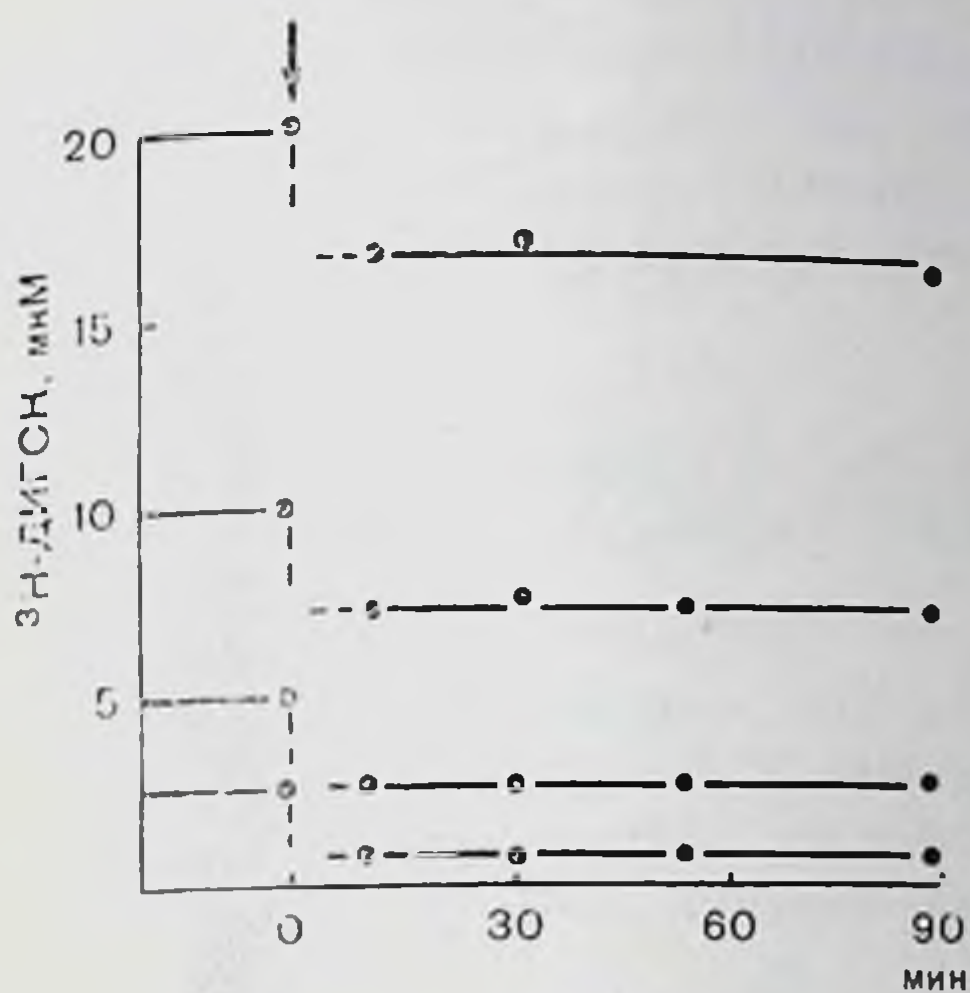


рис. 66. Изменение концентрации ДИГСК в среде после добавления эритроцитов.

Гематокрит 10%. Стрелка указывает момент смешивания эритроцитов со средой. Кривые представлены для четырех различных концентраций ДИГСК; 37 °С, рН 7,4 [8].

рис. 67. Связывание ДИГСК как функция концентрации ДИГСК в среде.

Верхняя кривая — суммарное связывание. Ее положение мало меняется со временем, в результате чего данные для 15 и 90 мин инкубации ложатся на одну линию. Необратимое связывание, представленное на двух нижних кривых, определено после промывания клеток альбуминсодержащим раствором. Время инкубации для достижения необратимого связывания обозначено на рисунке; 30 °С, рН 7,4 [6].

ДИГСК с клетками удается, отмывая их альбуминсодержащим буферным раствором, который удаляет обратимо связанный ингибитор. Необратимое связывание с мембранами меньше обратимого при концентрациях ДИГСК в среде около 3 мкМ (данные не показаны) и имеет тенденцию к насыщению. Степень необратимого связывания увеличивается со временем. Это свидетельствует, что после начальной быстрой стадии нековалентного связывания происходит медленный переход обратимо связанного ДИГСК в необратимо связанный благодаря ковалентному взаимодействию с компонентами мембраны, а именно с белком полосы 3 (см. рис. 67). Переход обратимо связанного ДИГСК в необратимо связанный следует кинетике первого порядка

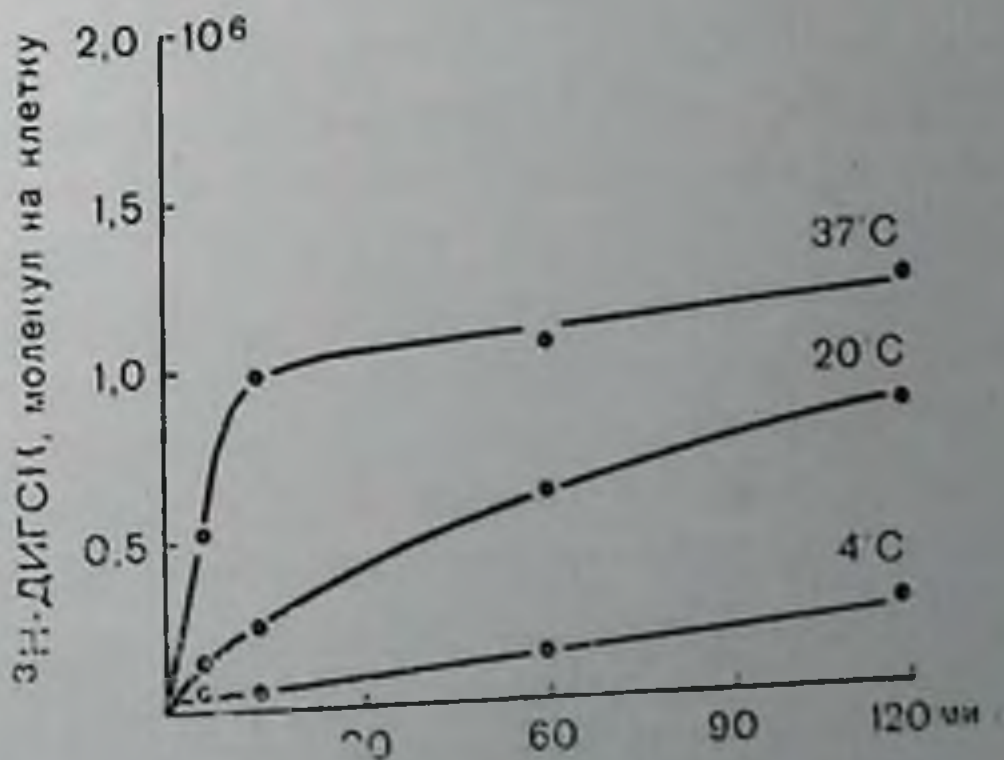


рис. 68. Переход от обратимого к необратимому связыванию ДИГСК в белке полосы 3.

Гематокрит 10%, рН 7,4. Инактивные клетки инкубировали в среде с 25 мкМ ДИГСК при указанных на рисунке температурах. По истечении времени, указанного на оси абсцисс, клетки осаждали и 1 раз промывали раствором, содержащим 0,5% альбумина, и 2 раза раствором без альбумина [8].

(рис. 68) и зависит от температуры, имея энергию активации  $E_A = 22$  ккал/моль [6]. Этот процесс зависит также от pH [11]. Максимальное связывание ингибитора с белком полосы 3 всегда составляет около  $1-1,2 \cdot 10^6$  молекул на клетку, или 1 молекула ДИГСК на молекулу белка полосы 3.

### ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОФЕНИЛИРОВАНИЯ НА ПОСЛЕДУЮЩЕЕ СВЯЗЫВАНИЕ ДИГСК

Динитрофенилирование мембран эритроцитов до действия ДИГСК ведет к ингибированию анионного транспорта и воздействует как на обратимое, так и на необратимое связывание ДИГСК. Удобнее рассмотреть сначала влияние на необратимое связывание и сравнить наблюдаемые эффекты с параллельными изменениями в транспорте анионов.

#### Влияние динитрофенилирования на транспорт анионов и на способность белка полосы 3 необратимо связывать ДИГСК

После динитрофенилирования при различных концентрациях ФДНБ и удаления непрореагировавшего ФДНБ промыванием в каждом случае суспензию тений эритроцитов делили на две порции. Одну порцию использовали для измерения потоков, а другую — для определения способности белка полосы 3 необратимо связывать ДИГСК. В последнем случае динитрофенилированные тени инкубировали в присутствии высоких концентраций ДИГСК в течение 90 мин при  $37^\circ\text{C}$ . В таких условиях все связывающие ДИГСК центры, которые не оказались блокированы ФДНБ, будут необратимо связывать ДИГСК и, следовательно, их число может быть определено. Следует отметить, что динитрофенилирование небольшого числа центров эквивалентно сохранению большого числа центров необратимого связывания ДИГСК и наоборот. Учитывая это, обратимся к рис. 69. Из него следует, что динитрофенилирование при повышенных концентрациях ФДНБ ведет к параллельному понижению анионного транспорта (рис. 69, А) и числа связывающих центров для необратимого связывания ДИГСК в белке полосы 3 (рис. 69, Б). Заметим, что результаты измерений транспорта анионов представлены в терминах констант скорости  $^0k_s$  и выполнены в условиях равновесия. Таким образом, среда внутри тений идентична среде снаружи. Определение объема при помощи счетчика Coulter с использованием приспособления для гидродинамического фокусирования показало, что в наших условиях изменения объема пренебрежимо малы независимо от присутствия или отсутствия различных использованных в этой работе ингибиторов. Из этого же рисунка видно, что отношение между числом необратимо связывающих центров для ДИГСК и скоростью анионного транспорта описывается функцией, близкой к линейной (рис. 69, В). Следовательно, любая



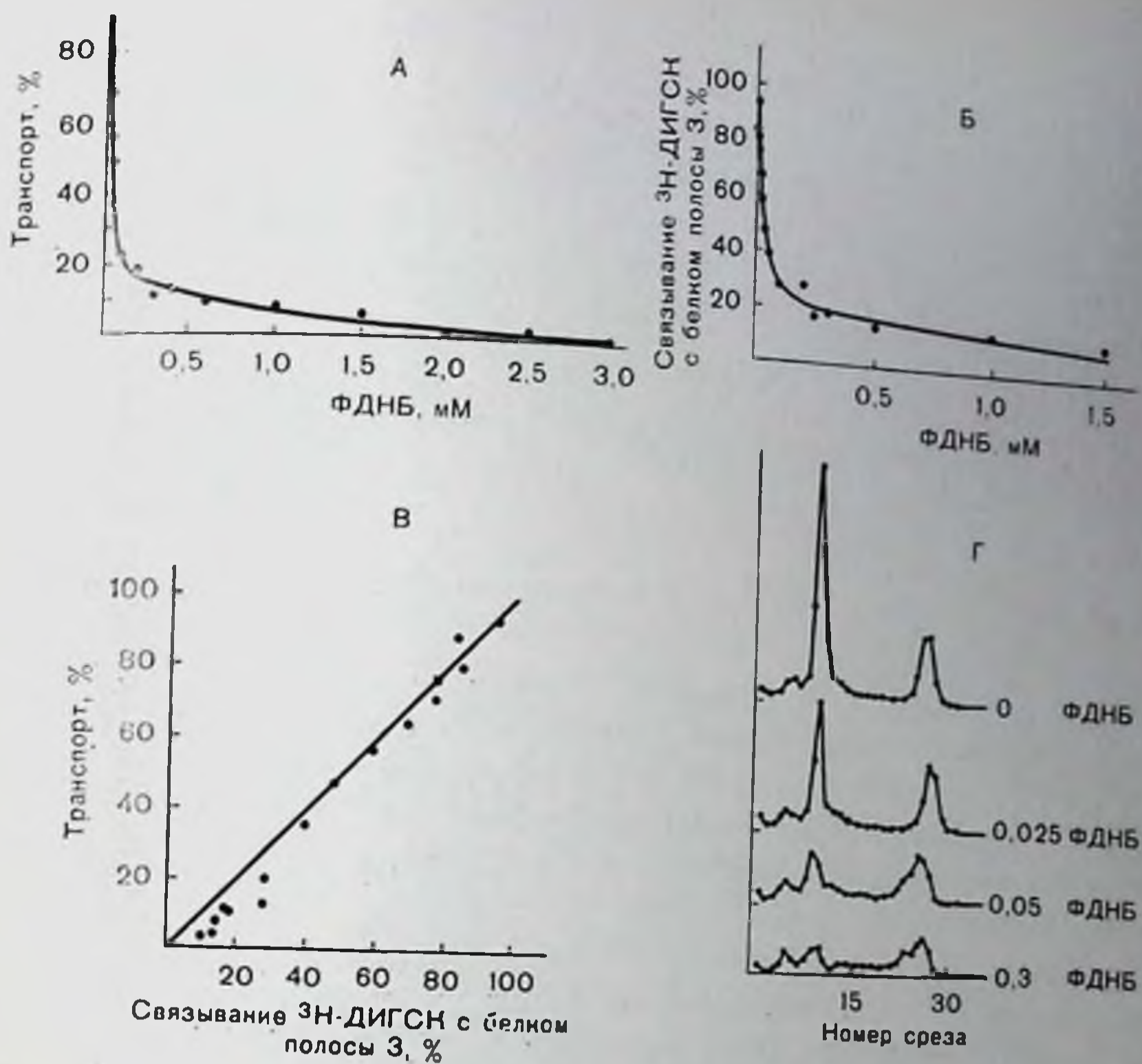


Рис. 69. Влияние динитрофенилпроваания при различных концентрациях ФДНБ на равновесный обмен («транспорт») сульфата (А) и на способность белка полосы 3 связывать ДИГСН (Б). Приведенные кривые представляют собой сумму двух экспонент (см. уравнение 1 в подписе к табл. 17). На графике (В) соответствующие значения для транспорта отложены в зависимости от способности белка полосы 3 связывать ДИГСН. Константа скорости транспорта при 100% составляет  $15,0 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>, связывающая способность при 100% —  $1,38 \cdot 10^6$  молекул ДИГСН на клетку. Показано (Г) распределение триптированного ДИГСН на электрофореграммах в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия мембран тещей эритроцитов, предварительно подвергнутых инкубации с 25 мкМ триптированным ДИГСН в течение 90 мин при 37 °С после динитрофенилпроваания под действием концентрации ФДНБ, указанной на рисунке, в течение 30 мин при 37 °С. Пики на срезах 9—10 соответствуют связыванию с полосой 3, тогда как пики на срезах 25—26 — связыванию с липидами (см. подпись к рис. 74).

молекула белка полосы 3 после динитрофенилпроваания по связывающему ДИГСН центру перестает функционировать как транспортирующая единица.

Несмотря на продемонстрированное соотношение 1 : 1 между вызванными ФДНБ изменениями в анионном транспорте и числом центров ковалентного связывания ДИГСН, было обнаружено, что действие различающихся концентраций ФДНБ на скорость модификации связывающих ДИГСН центров и транспорт анионов не следует кинетике первого порядка: при построении в полулогарифмических координатах наши данные обнаруживают явное

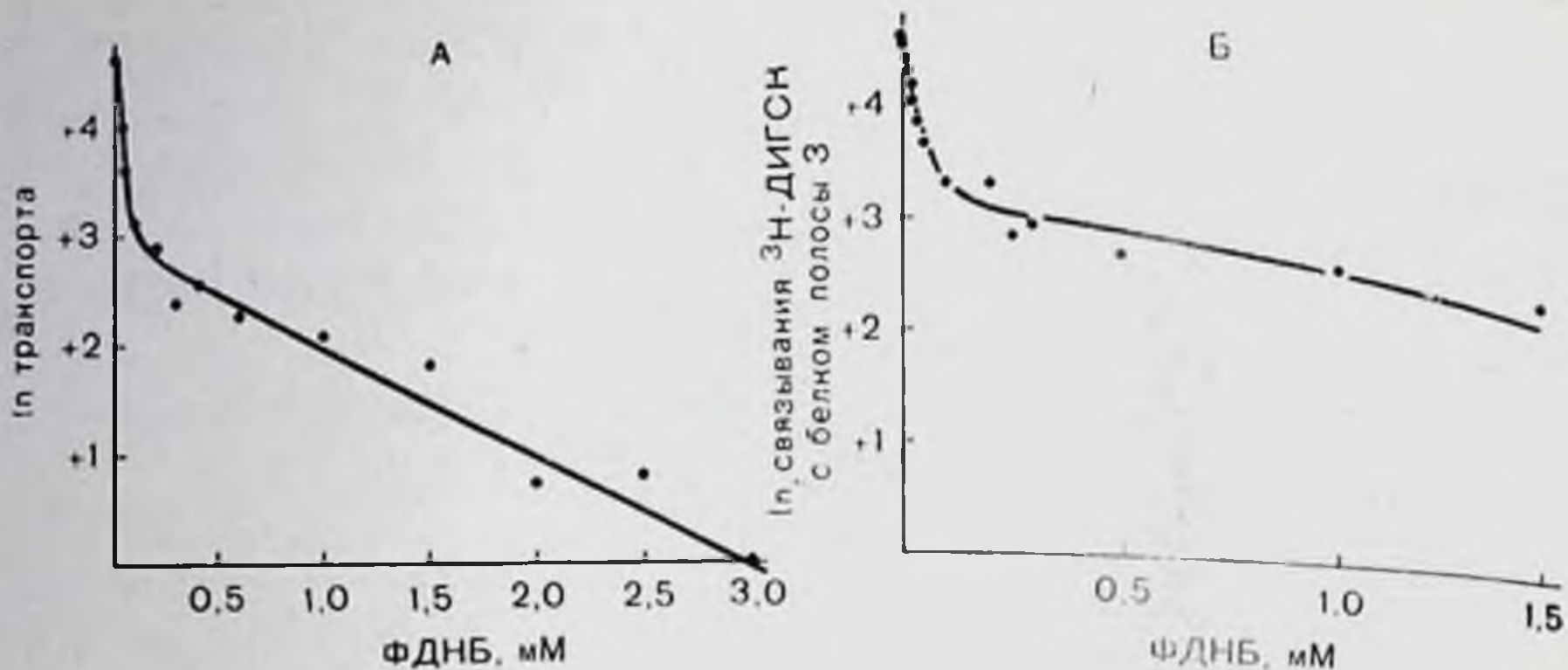


Рис. 70. Данные рис. 69, А и Б в полулогарифмических координатах.

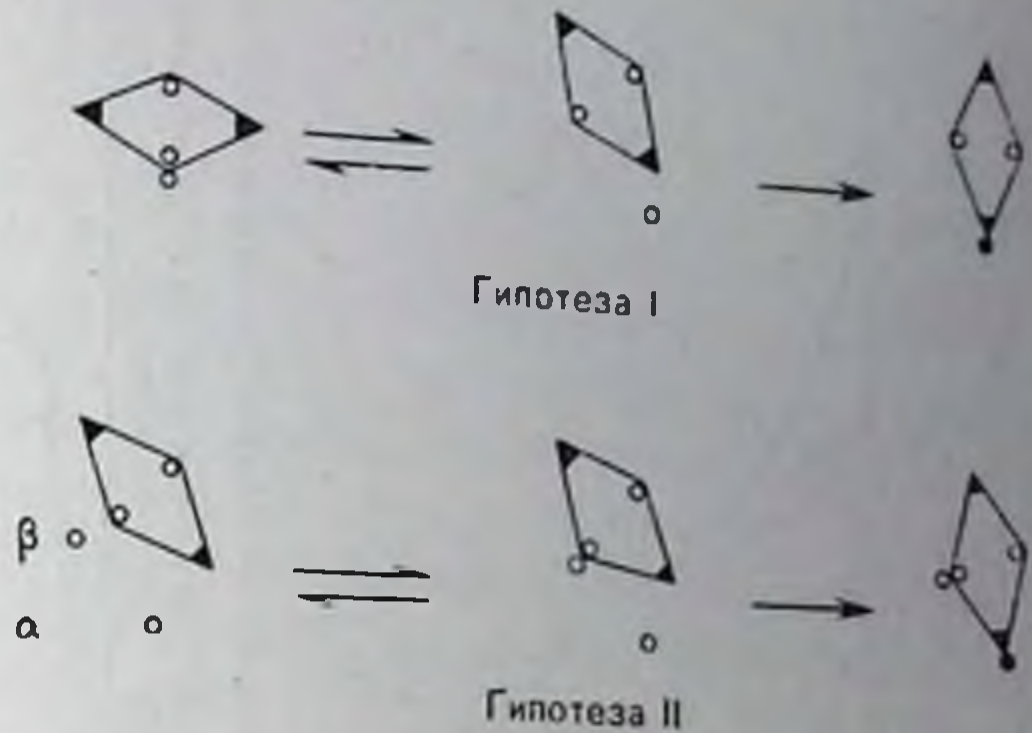
отклонение от прямой линии и, следовательно, от характерного для подобной реакции одноэкспонентного вида (рис. 70). Кинетика псевдопервого порядка в этом случае ожидалась, исходя из того, что необратимому взаимодействию ФДНБ с мембранными центрами не предшествует стадия обратимого связывания [10] и что эксперименты выполнялись в условиях, при которых концентрация ФДНБ в процессе эксперимента изменялась очень незначительно. Более тщательный анализ экспериментальных данных показал, что эффекты изменяющихся концентраций ФДНБ на мембранный транспорт могут быть описаны двумя экспонентами (сплошные линии на рис. 69, А и Б). На основании этого мы полагаем, что связывание ФДНБ с белком полосы 3 происходит по двум связывающим центрам. Связывание по одному из этих центров, названному центром  $\alpha$ , предотвращает последующее ковалентное взаимодействие ДИГСК и ингибирует транспорт. Связывание по другому центру, названному центром  $\beta$ , повышает скорость динитрофенилирования ингибиторного центра  $\alpha$ , но само по себе непосредственно в ингибировании не участвует. Хотя такая двухцентровая модель и согласуется с экспериментальными данными, она может быть и не единственной. Однако дополнительное и независимое доказательство существования двух различных центров связывания ФДНБ может быть получено из детального сравнения эффектов динитрофенилирования при различных концентрациях ФДНБ на обратимое и необратимое связывание ДИГСК.

### Влияние динитрофенилирования на обратимое и необратимое связывание ДИГСК

Для объяснения того факта, что связывание ДИГСК проходит две последовательные стадии — быстрое обратимое связывание, за которым следует медленное необратимое связывание, ранее выдвигали две различные гипотезы (рис. 71). Обе они базировались на том, что молекула ДИГСК содержит две реакционноспо-

Рис. 71. Обратимое и необратимое связывание ДИГСК в соответствии с двумя гипотезами, изложенными в тексте.

Молекула ДИГСК представлена в виде параллелограмма, в котором светлые кружки соответствуют сульфокислотным группам, а черные уголки — изотиоцианатным остаткам. Связывающие центры белка полосы 3 обозначены светлыми или черными кружками, символизирующими соответственно нековалентное или ковалентное связывание.



собные группы: отрицательно заряженные сульфопильные группы, способные к образованию ионных связей, и изотиоцианатные группы, способные к образованию ковалентных связей. Согласно первой гипотезе, разумное объяснение может быть дано, исходя из допущения, что индивидуальный мембранный центр способен обратимо реагировать с сульфокислотной группой и необратимо — с изотиоцианатной группой молекулы ДИГСК. Поскольку аффинность обратимого связывания ДИГСК и мембранного центра исключительно высока (по-видимому,  $K_1$  ниже 0,5 мкМ), скорость диссоциации должна быть немного меньше, чем скорость связывания, и является, вероятно, скоростьюопределяющей стадией образования ковалентной связи. Это должно вести к существованию быстрой стадии обратимого связывания и следующей за ней медленной стадии обратимого связывания. Согласно второй гипотезе [1], постулируется существование на мембране двух типов связывающих центров. Предполагается, что один из них представляет собой положительно заряженную группу, участвующую в первоначальном обратимом связывании. Поскольку ингибирование происходит мгновенно и может также вызываться дисульфоновыми кислотами, неспособными к последующей реакции ковалентного связывания, постулируется, что именно эти мембранные центры вовлечены в ингибирование транспорта анионов. Последующая медленная реакция ковалентного связывания происходит по другому центру, который может и не относиться к анионному транспорту. Другими словами, согласно этой гипотезе, происходящая реакция напоминает аффинное мечение: специфическая молекулярная конфигурация направляет молекулу ДИГСК в контролирующей транспорт центр, тогда как реакционноспособная группа молекулы фиксирует ее затем через образование ковалентной связи на другом, не участвующем в транспорте центре, находящемся в непосредственной близости от первого.

Динитрофенилирование мембран эритроцитов до инкубации с ДИГСК может явиться инструментом, позволяющим различать две названные гипотезы. Связывание ФДНБ с индивидуальным центром, постулированное в первой гипотезе, должно предотвратить как нековалентное, так и ковалентное связывание ДИГСК.

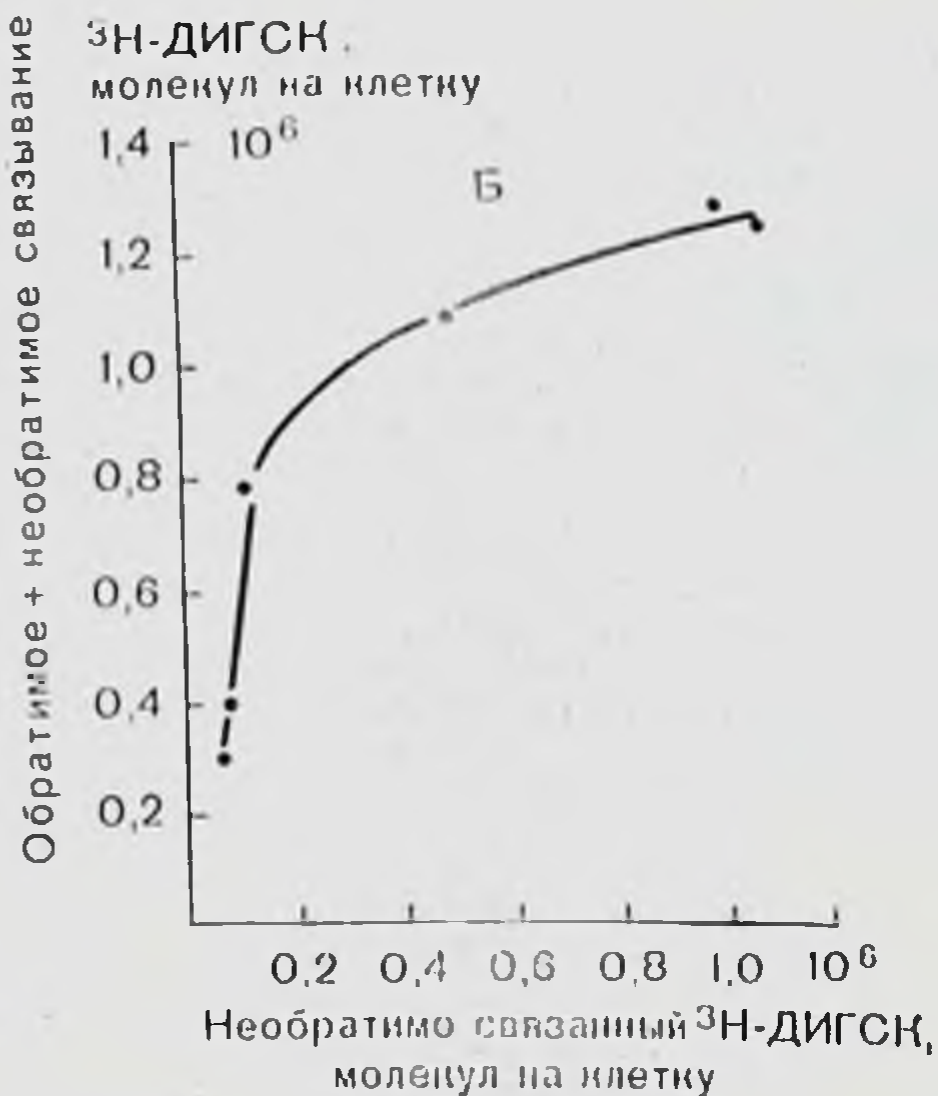


Рис. 72. Влияние динитрофенилирования при различных концентрациях ФДНБ на последующее связывание ДИГСК.

Динитрофенилирование вели в течение 30 мин при рН 7,4, 37 °С и концентрации ФДНБ, указанной на рисунке. После удаления перореагировавшего ФДНБ промыванием, связывание ДИГСК определяли после обработки клеток 3 мкМ ДИГСК в течение 60 мин при 37 °С. Гематокрит 10%. А — зависимость связывания ДИГСК на клетку от концентрации ФДНБ, при которой проводили динитрофенилирование; Б — сумма обратимого и необратимого связывания на клетку в зависимости от необратимого связывания на клетку (объяснение см. в тексте) [8].

В противоположность этому связывание ФДНБ лишь по одному из двух центров, постулированных во второй гипотезе, может предотвратить ковалентное связывание ДИГСК, но не должно заметно сказаться на нековалентном связывании ДИГСК, или наоборот. Только в особом случае, если оба предполагаемых центра будут обладать одинаковой доступностью для нитрофенилирования возможно одинаковое нарушение и ковалентного и нековалентного связывания ДИГСК, как предсказывает первая гипотеза (см. рис. 71).

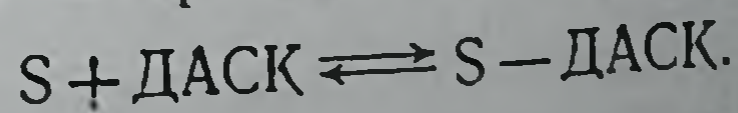
Экспериментально было обнаружено, что динитрофенилирование мембран эритроцитов в разной степени сказывается на обратимом и необратимом связывании ДИГСК. Это иллюстрируется данными рис. 72, где показано связывание ДИГСК с модифицированными клетками, измеренное в условиях, когда оно практически полностью происходит с белком полосы 3 (низкая концентрация ДИГСК, непродолжительное время инкубации). Показано, что динитрофенилирование при малых концентрациях ФДНБ, когда блокируется  $\alpha$ -центр, резко понижает необратимое связывание ДИГСК, как это определено после промывания клеток альбуминсодержащим раствором, но оказывает значительно меньшее влияние на суммарное обратимое и необратимое связывание, как это рассчитано по уменьшению концентрации добавленного ДИГСК в супернатанте клеточной суспензии (рис. 72, Б). Следовательно, количество обратимо связанного ДИГСК повышается за счет необратимо связанного (рис. 72, А) или, иными словами,

происходит блокирование перехода из обратимо в необратимо связанное состояние. На рис. 72, А, Б показано также, что после динитрофенилирования при высоких концентрациях ФДНБ, когда модифицируется и  $\beta$ -центр, понижается, наконец, и обратимое связывание ДИГСК. Для интерпретации полученных данных, естественно, приходится допустить существование двух связывающих центров, различающихся по своей доступности для динитрофенилирования. Разумно предположить, что связывающий центр для ФДНБ, по которому происходит также ковалентное связывание ДИГСК, идентичен ингибирующему транспорт анионов центру  $\alpha$ , тогда как связывающий ФДНБ центр, по которому происходит и нековалентное связывание ДИГСК, может быть идентичен другому центру —  $\beta$ , расположенному в непосредственной близости от центра  $\alpha$ . Поскольку динитрофенилирование  $\alpha$ -центра ведет к ингибированию, можно полагать, что реакция изоцианатных групп ДИГСК также вызывает изменения, которые даже в отсутствие обратимого связывания с  $\beta$ -центром, обуславливают ингибирование транспорта. Таким образом, хотя наши результаты и соответствуют двухцентральной модели связывания ДИГСК, они не подтверждают соображение, что необратимая фиксация ДИГСК благодаря образованию ковалентной связи происходит по центру, не имеющему отношения к транспорту. Следовательно, они не соответствуют концепции аффинного мечения в ее первоначальном виде (вторая гипотеза).

Очевидно, что двойное действие ФДНБ на связывание ДИГСК, описанное выше, не только подтверждает двухцентровую модель связывания ДИГСК, но и дает более прямое доказательство существования  $\alpha$ - и  $\beta$ -центров, связывающих ФДНБ, чем на основе чисто кинетических данных.

### ВЛИЯНИЕ ОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ ПРОИЗВОДНОГО СТИЛЬБЕНДИСУЛЬФОКИСЛОТЫ ДАСК НА ДИНИТРОФЕНИЛИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ ДИГСК ЦЕНТРОВ В БЕЛКЕ ПОЛОСЫ 3

ДАСК имеет ту же структуру, что и ДИГСК, за исключением того, что два изотопцианатных остатка в положениях 4 и 4' заменены ацетамидогруппами. Вследствие этого ДАСК не способна к обратимому связыванию с мембраной. Тем не менее это соединение сохраняет способность ингибировать транспорт [2, 9, 14]. Его действие на транспорт может быть описано простой реакцией, соответствующей закону действующих масс и предусматривающей наличие одного набора связывающих центров на мембране:



В этом уравнении S должно представлять собой индивидуальную химическую группу или особое образование из нескольких различных групп, например из двух положительно заряженных аминок групп. На рис. 73 показано, что зависимость обратного значения

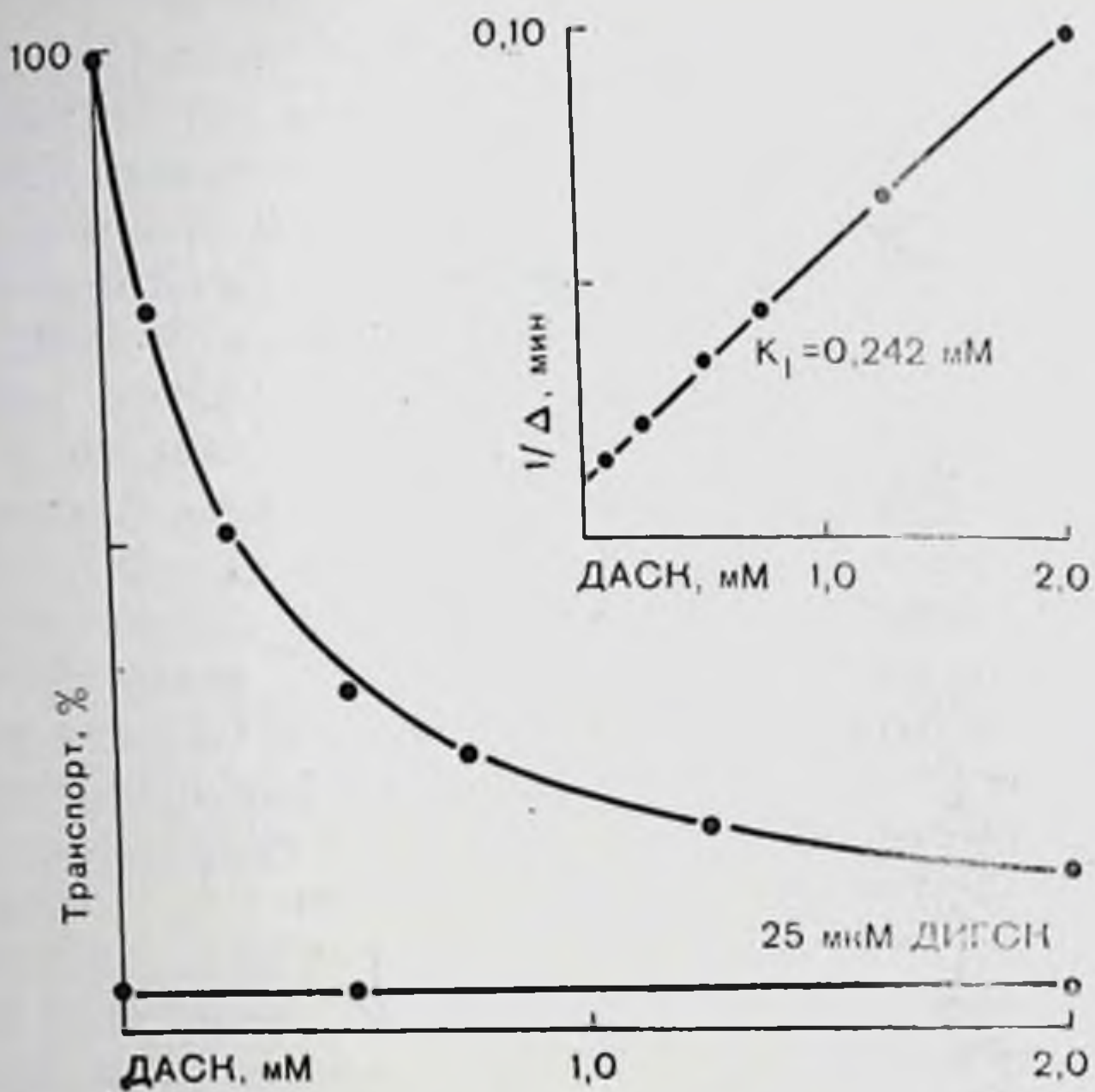


Рис. 73. Влияние ДАСК на равновесный обмен («транспорт») сульфата. По оси ординат — константа скорости транспорта в процентах от контрольной; 100% соответствует  $16,8 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$  ( $37^\circ \text{C}$  pH 7,4); 25 мкМ ДИГСК соответствует остаточному транспорту, измеренному в присутствии 25 мкМ агента в среде, содержащей ДАСК. Внутренний рисунок — те же данные, представленные в координатах Диксона; по оси ординат — обратное значение  $\Delta$ , где  $\Delta$  представляет собой разницу констант скоростей, измеренных в присутствии и в отсутствие 25 мкМ ДИГСК.

анионного транспорта от концентрации ДАСК дает прямую линию со значением  $K_1$  0,242 мМ (среднее значение из трех измерений составляет 0,225). Подобное значение (0,215, среднее из двух измерений) было получено в экспериментах с тениями эритроцитов, которые до определения потоков были подвергнуты динитрофенилированию в условиях, при которых более 90% центров, связанных с первой из двух экспонент уравнения 1 ( $\alpha$ -центров), претерпевает инактивацию. Этот результат указывает на гомогенность популяции связывающих ДАСК центров.

Как уже упоминалось, предполагается, что ДАСК ингибирует анионный транспорт за счет взаимодействия с теми же центрами, которые вовлечены в обратимое связывание ДИГСК. Взаимодействие ДАСК с этими центрами может быть продемонстрировано исходя из данных по влиянию этого агента на скорость динитрофенилирования транспортирующей анионы системы и связывающих ДИГСК центров в белке полосы 3. В этих экспериментах тении эритроцитов инкубировали при различных концентрациях ДАСК в присутствии постоянной концентрации ФДНБ в течение 30 мин при  $37^\circ \text{C}$ . После удаления избытка ингибиторов промыванием каждый образец разделяли на два: первый из них использовали для измерений равновесного обмена сульфата, а второй — для определения сохраняющейся способности связывать

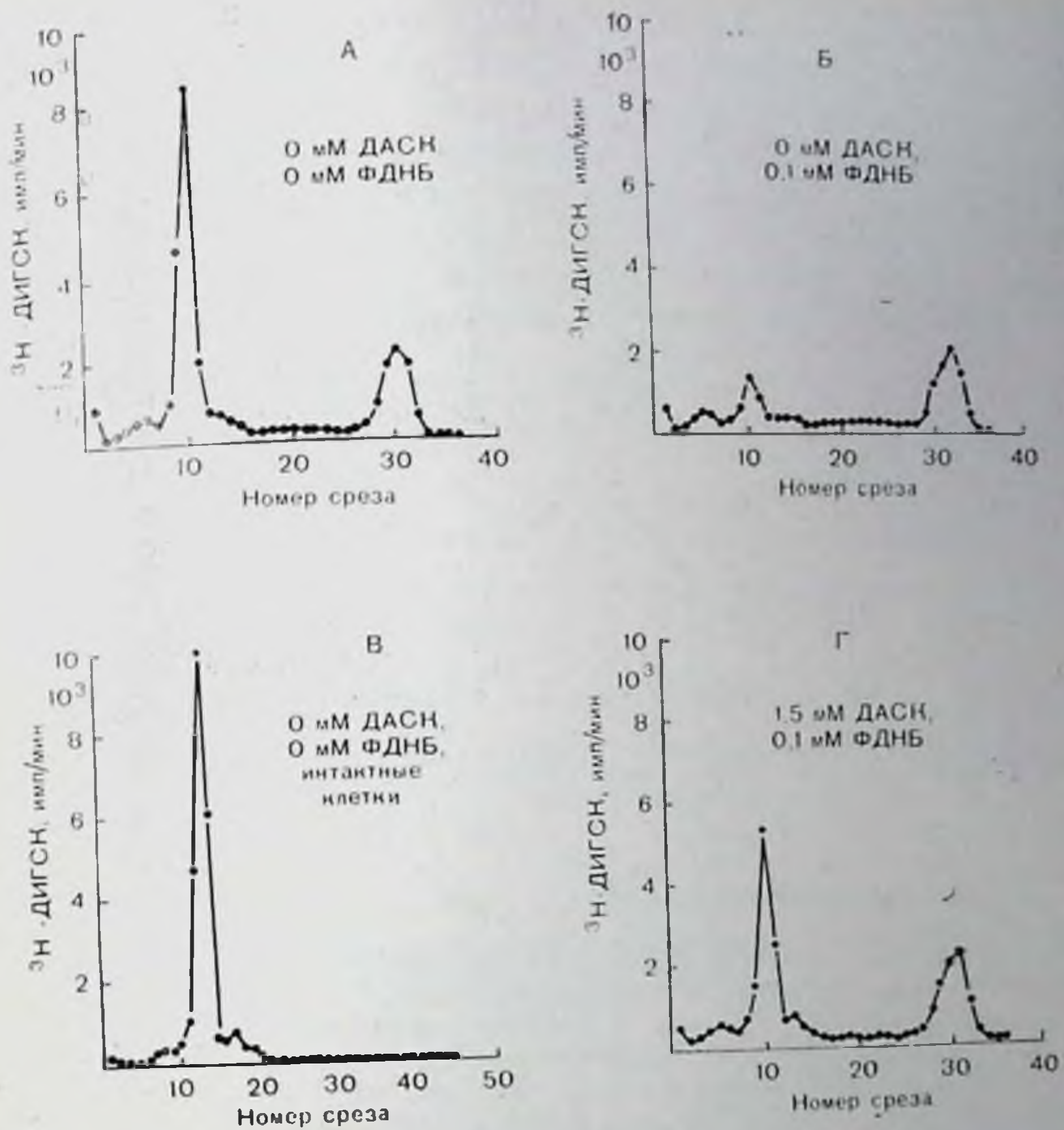


Рис. 74. Распределение радиоактивности при гель-электрофорезе мембран эритроцитов в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Клетки предварительно обрабатывали 25 мкМ ДИГСК в течение 90 мин при 37 °С. Эксперименты проводили с тенями эритроцитов, которые были предварительно обработаны следующим образом: предварительной обработки не было (А), динитрофенилирование в присутствии 0,1 мМ ФДНБ в течение 30 мин при 37 °С и рН 7,4 (В); динитрофенилирование в тех же условиях при дополнительном присутствии 1,5 мМ ДАСК (В), связывание ДИГСК с необработанными интактными клетками (Г). Пики на срезах 10 в случаях А, Б и В и на срезе 13 в случае Г относятся к белку полосы 3. Пики на срезах 30—32 в случаях А, Б и В относятся к меченым липидам. Меченые липиды обнаруживают только в случае теней эритроцитов, но не в случае мембран, полученных из обработанных ДИГСК интактных клеток.

ДИГСК. Результаты этих экспериментов суммированы на рис. 74 и 75. Они показывают, что ДАСК понижает и скорость динитрофенилирования связывающих ДИГСК центров в белке полосы 3 (рис. 74 и 75, Б) и скорость динитрофенилирования транспортирующей анионы системы (рис. 75, А). Зависимости соответствующих нормализованных значений связывания ДИГСК и транспорта анионов друг от друга дают прямую линию во всем интервале эффектов от 0 до 100% (рис. 75, В).

Влияние ДАСК на скорость динитрофенилирования было также изучено в экспериментах, когда оно проводилось при постоянной концентрации ДАСК и переменной концентрации ФДНБ, а

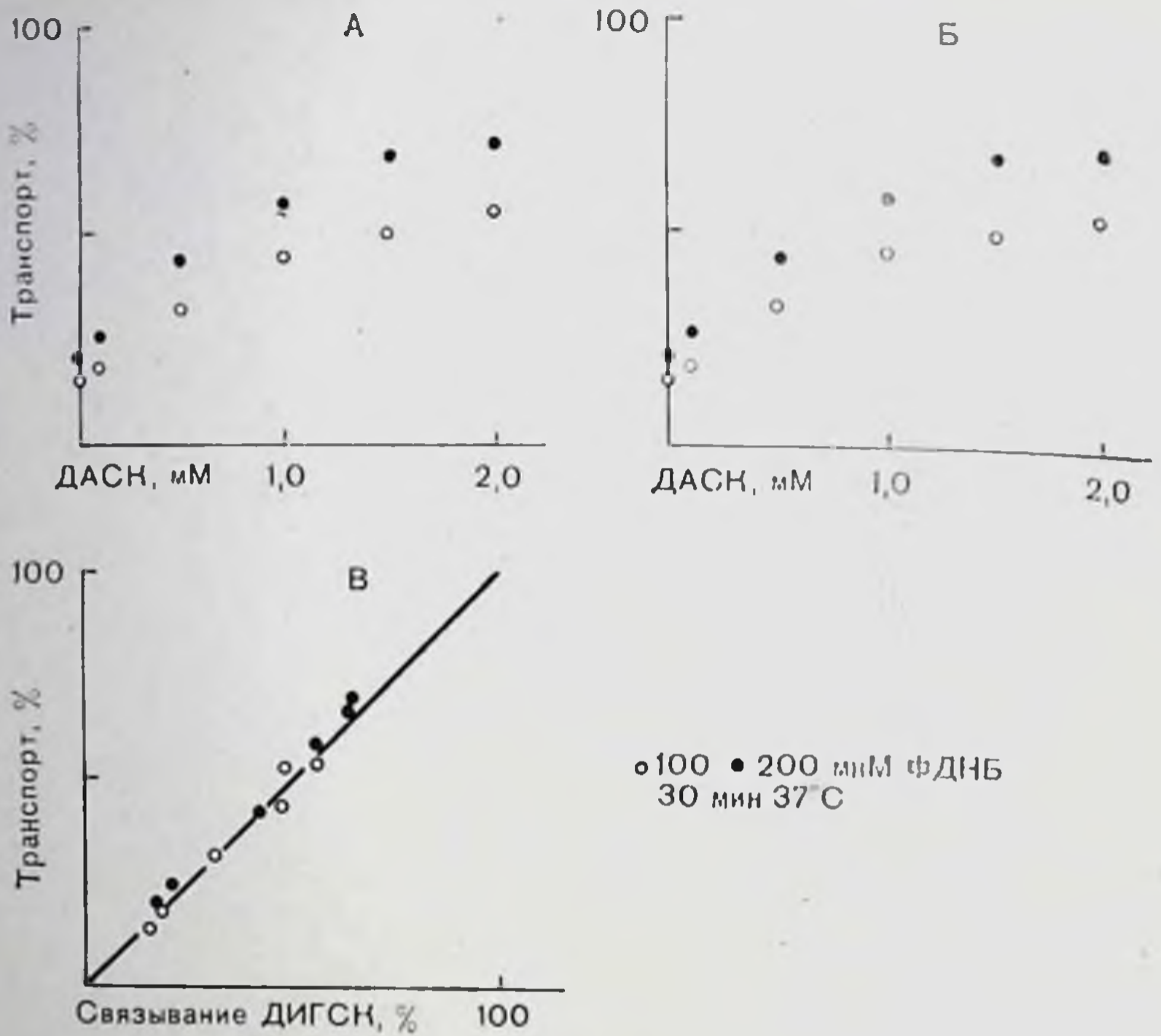


Рис. 75. Влияние ДАСК на динитрофенилирование системы транспорта анионов (А) и центров (Б), связывающих ДИГСК в белке полосы 3. Перед измерением транспорта анионов и связывания ДИГСК проводили обработку ФДНБ (концентрация 0,1 мкМ — светлые кружки, 0,2 мкМ — черные кружки) в течение 30 мин при 37 °С. Указана зависимость транспорта от способности связывать ДИГСК для данных, полученных при соответствующих концентрациях ДАСК (В). Константа скорости транспорта и число связанных на клетку молекул ДИГСК при 100% составляют  $16 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup> и  $1,2 \cdot 10^6$  соответственно.

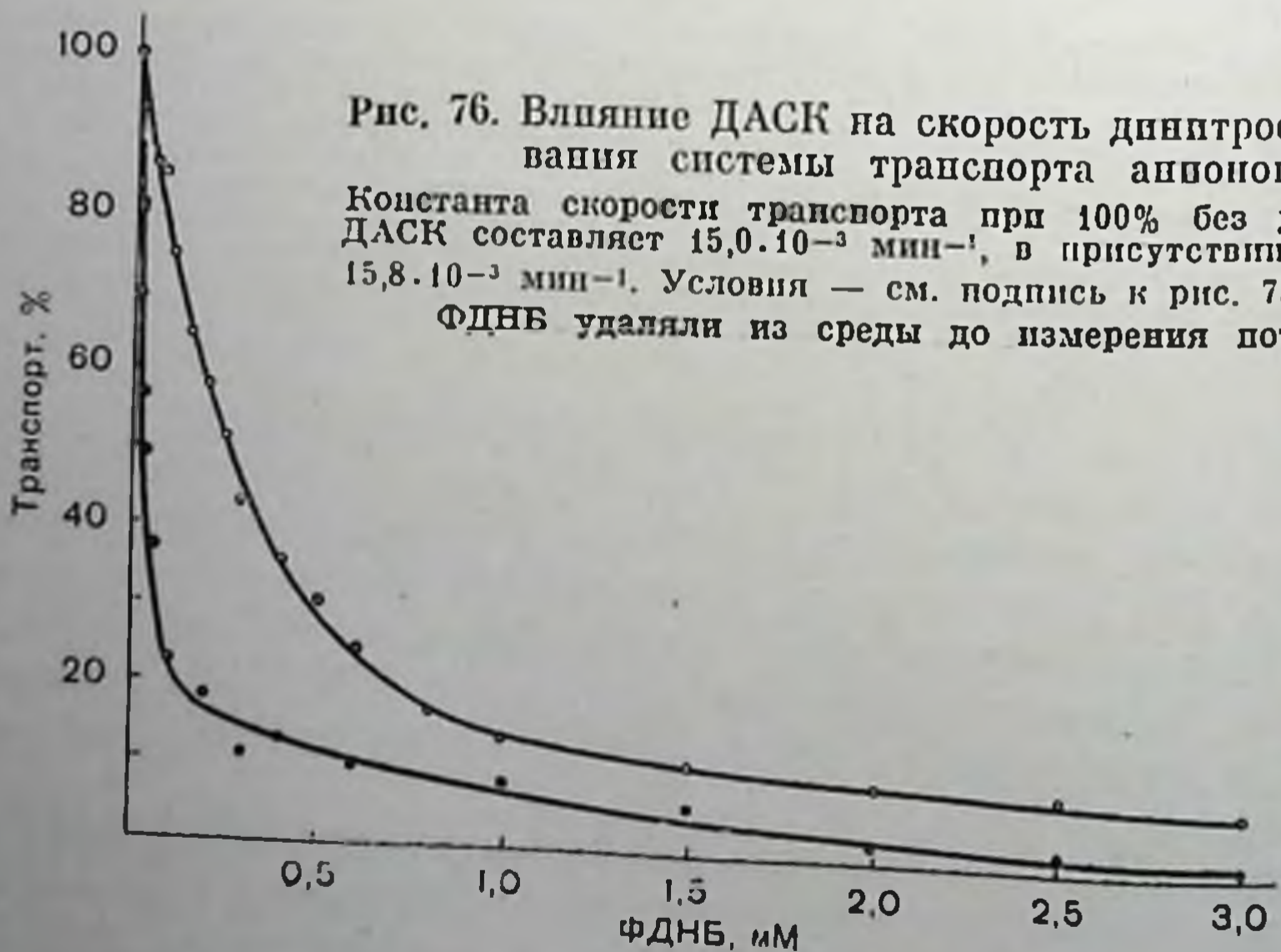


Рис. 76. Влияние ДАСК на скорость динитрофенилирования системы транспорта анионов.

Константа скорости транспорта при 100% без добавления ДАСК составляет  $15,0 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>, в присутствии ДАСК —  $15,8 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>. Условия — см. подпись к рис. 75. ДАСК и ФДНБ удаляли из среды до измерения потоков.



все остальные экспериментальные условия совпадали с изложенными в предыдущем параграфе. Было обнаружено, что зависимость транспорта и связывающей способности белка полосы 3 по отношению к ДИГСК от концентрации ФДНБ описывается суммой двух экспонент и дает ту же общую картину, которая наблюдалась только в присутствии ФДНБ и без ДАСК (рис. 76, данные о связывании ДИГСК не показаны). Как видно из полученных результатов  $K_1$  и  $K_2$  понижаются в присутствии ДАСК (табл. 17).

Т а б л и ц а 17

	$A_1$	$A_2$	$K_1$	$K_2$
Без ДАСК	79,9	19,7	30,9	1,07
В присутствии 2 мМ ДАСК	86,4	13,5	3,33	0,174*

Примечание. Динитрофенилирование анионтранспортирующей системы при различных концентрациях ФДНБ в присутствии или в отсутствие ДАСК: влияние ДАСК на значения констант  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $K_1$ ,  $K_2$  в уравнении:

$${}^{\circ}k_S = A_1 e^{-K_1[\text{ФДНБ}]_t} + A_2 e^{-K_2[\text{ФДНБ}]_t} \quad (1)$$

${}^{\circ}k_S$  представляет собой константу скорости равновесного обмена сульфита после динитрофенилирования в течение времени  $t$  при независимой от времени концентрации [ФДНБ]. Условия: тени эритроцитов, рН 7,4, температура 37 °С. Константы рассчитаны методом наименьших квадратов. Данные нормированы к значению  ${}^{\circ}k_S = 100$  для концентрации ФДНБ = 0.

\* Обсуждение ограничений точности определения см. в тексте.

Однако изменение этих констант, особенно  $K_2$ , сложно оценить количественно. Данные, полученные в присутствии ДАСК (но не в ее отсутствие), хорошо соответствуют допущению, что  $K_2 = 0$ . С незначительными изменениями констант  $A_1$ ,  $A_2$  и  $K_1$  компьютер дает кривую, почти так же хорошо совпадающую с экспериментом, как и при отсутствии определенного значения  $K_2$ . Это следует помнить при интерпретации полученных данных.

Приведенные результаты подтверждают, что центры обратимого связывания ДАСК (и, вероятно, ДИГСК) расположены на белке полосы 3 вблизи центров необратимого связывания ФДНБ или изотиоцианатных остатков ДИГСК. Как только центр  $\beta$  занимает молекулой ДАСК (или обратимо связанной молекулой ДИГСК), взаимодействие с ним предотвращается и скорость взаимодействия ФДНБ с центром  $\alpha$  сильно понижается. Таким образом, обратимая модификация центра  $\beta$  дисульфоновой кислотой сказывается на скорости динитрофенилирования центра  $\alpha$ , как и необратимая модификация центра  $\beta$  ФДНБ. В противоположность динитрофенилированию обратимое связывание с дисульфоновой кислотой ассоциировано с ингибированием транспорта, т. е. пространственная конфигурация белка полосы 3 вблизи центра  $\beta$  такова, что связывание объемных кислот и, возможно, индуцированные им конформационные изменения в молекуле

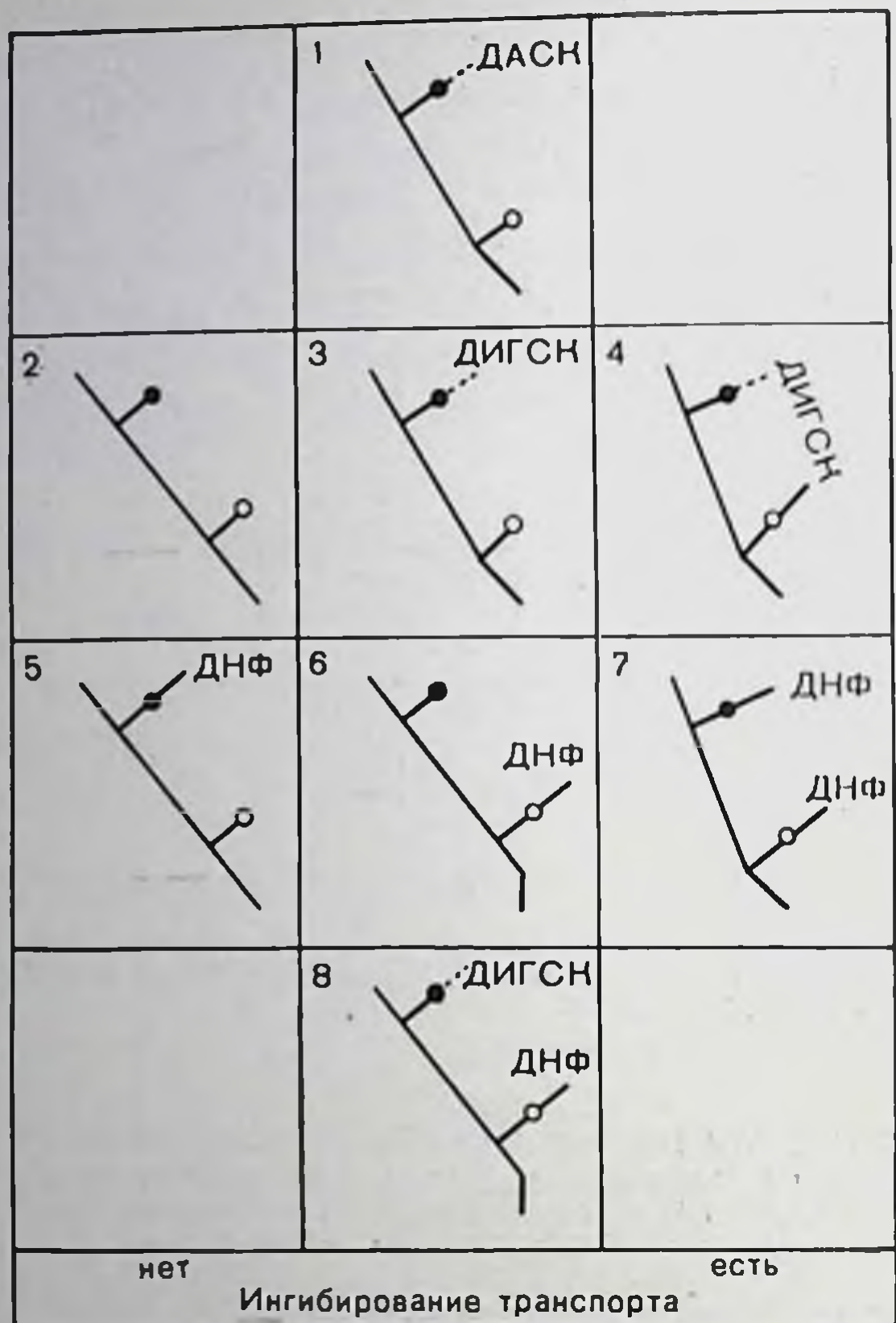


Рис. 77. Схематическое изображение связывающих центров  $\alpha$  (светлые кружки) и  $\beta$  (черные кружки) и их взаимодействия с ФДНБ, ДАСК и ДИГСН. Динитрофенилирование незапятных центров может происходить по  $\beta$  (5),  $\alpha$  (6) или по  $\alpha$  и  $\beta$  (7). Модификация  $\beta$  (5) не вызывает ингибирования транспорта, но понижает скорость динитрофенилирования  $\alpha$  (7). Динитрофенилирование  $\alpha$  (6) ведет к ингибированию транспорта, но оказывает незначительное влияние на нековалентное связывание ДИГСН с  $\beta$  (8). Связывание ДАСК с  $\beta$  (1) понижает скорость динитрофенилирования  $\alpha$  и  $\beta$ . ДИГСН связывается нековалентно с  $\beta$  (3) и ковалентно с  $\alpha$ , по-видимому, без разрыва нековалентной связи с  $\beta$  (4). ДНФ означает динитрофенильный остаток. Сплошная линия—ковалентная связь; точки—нековалентная связь; светлые кружки— $\alpha$ , черные кружки— $\beta$ .

значение  $K_2$  несколько меньше, чем  $K_1$  (см. табл. 17). Тем не менее до получения более точных данных такое объяснение является лучшей основой для дальнейших размышлений, ибо оно соответствует общей схеме, вырисовывающейся из нашего исследования.

белка ведут к ингибированию, тогда как присоединение динитрофенильного остатка этого ингибирования не вызывает. Кроме того, можно полагать, что конформационные изменения, вызванные динитрофенилированием центра  $\beta$ , отличаются от обусловленных электростатическим и (или) гидрофобным связыванием дисульфоновых кислот. Именно это может явиться причиной отсутствия ингибирования в первом случае и более полной блокады во втором.

Обнаружение того, что ДАСК влияет на динитрофенилирование как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -центра, качественно согласуется с предположением, что нековалентное связывание по центру  $\beta$  предохраняет как центр  $\beta$ , так и центр  $\alpha$  от модификации. Однако с количественной точки зрения правомерность такого истолкования полученных данных неоднозначна. Экспериментальные результаты лишь дают набор значений  $K$ , которые не противоречат полученным. Этот интервал значений лежит между 0 и 0,17, и, таким образом, на верхнем пределе изме-

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентифицировано два центра связывания ФДНБ, различающихся по своей доступности для динитрофенилирования. Более доступный центр обозначен  $\alpha$ , менее доступный —  $\beta$ . Модификация  $\alpha$ -центра ведет к ингибированию транспорта анионов. В противоположность этому модификация  $\beta$ -центра не сказывается на транспорте. Однако она понижает скорость реакции между ФДНБ и центром  $\alpha$ . Это согласуется с предположением, что центры  $\alpha$  и  $\beta$  расположены недалеко друг от друга.

Взаимодействие ДИГСК с  $\beta$ -центром приводит к почти мгновенному обратимому связыванию и ингибированию. Затем медленное образование ковалентной связи с  $\alpha$ -центром ведет к необратимой фиксации ДИГСК. Это следует из того факта, что динитрофенилирование центра  $\alpha$  оказывает незначительное влияние на обратимое связывание ДИГСК, но резко понижает обратимое связывание. Динитрофенилирование  $\beta$ , достигаемое инкубацией клеток с ФДНБ в концентрациях, превосходящих необходимые для модификации  $\alpha$ -центра, также понижает обратимое связывание.

ДАСК, использованная в качестве нековалентно связывающегося аналога ДИГСК, понижает скорости динитрофенилирования как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -центров. Имеются определенные экспериментальные основания, чтобы предположить, что ДАСК, подобно ФДНБ, взаимодействует с  $\beta$ -центром, понижая, таким образом, скорость динитрофенилирования этого центра и центра  $\alpha$ . В последнем отношении эффект ДАСК напоминает эффект связывания ФДНБ по центру  $\beta$ . Однако в отличие от динитрофенилирования  $\beta$ -центра реакция этого центра с ДАСК приводит к ингибированию анионного транспорта. Все эти соображения суммированы на рис. 77.

Обнаружение того, что динитрофенилирование  $\beta$ -центра не ведет к ингибированию анионного транспорта, тогда как нековалентное связывание этого центра с ДАСК или ДИГСК приводит к ингибированию, требует некоторых комментариев. Неопубликованные данные указывают на то, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -центры являются скорее модифицирующими, чем переносящими. Таким образом, ингибирование вызывается некими аллостерическими эффектами, возникающими в ответ на связывание ингибитора. Наши результаты указывают, что природа этих изменений зависит от природы реакции на центр  $\beta$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cabantchik Z. I., Rothstein A. The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives. — *J. Membrane Biol.*, 1972, 10, 311—330.
2. Cabantchik Z. I., Rothstein A. Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. I. Localization of disulfonic stilbene binding sites in proteins involved in permeation. — *J. Membrane Biol.*, 1974, 15, 207—226.

3. *Drickamer L. K.* Fragmentation of the 95 000 Dalton transmembrane polypeptide in human erythrocyte membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 5115—5123.
4. *Halestrap A. P.* Transport of pyruvate and lactate into human erythrocytes. Evidence for the involvement of the chloride carrier and a chloride-independent carrier. — *Biochem. J.*, 1976, 156, 193—207.
5. *Ho M. K., Guidotti G.* A membrane protein from human erythrocytes involved in anion exchange. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 675—683.
6. *Lepke S., Fasold H., Pring M., Passow H.* A study of the relationship between inhibition of anion exchange and binding to the red blood cell membrane of 4',4'-diisothiocyano stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and its dihydro derivative (H<sub>2</sub>DIDS). — *J. Membrane Biol.*, 1976, 29, 147—177.
7. *Lepke S., Passow H.* The effect of incorporated trypsin on membrane proteins and anion transport in human red blood cell ghosts. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 455, 353—370.
8. *Lepke S., Passow H.* Effect of dinitrophenylation of the red cell membrane on non-covalent binding of H<sub>2</sub>DIDS (4,4'-diisothiocyano-dihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid). — *Biochim. Biophys. Acta* (submitted for publication), 1978.
9. *Passow H., Fasold H., Zaki L., Schuhmann B., Lepke S.* Membrane proteins and anion exchange in human erythrocytes. — In: *Biomembranes: Structure and Function*, Federation of the European Biochemical Society's Proceedings of the Ninth Meeting, Budapest, 1974, edited by G. Gardos, L. Szasz, 1975, v. 35, p. 197—214. North-Holland, Amsterdam, and Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest.
10. *Rothstein A., Cabantchik Z. I., Knauf P.* Mechanism of anion transport in red blood cells: role of membrane proteins. — *Fed. Proc.*, 1976, 35, 3—10.
11. *Ship S., Shami Y., Breuer W., Rothstein A.* Synthesis of tritiated 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulfonic acid (<sup>3</sup>H DIDS) and its covalent reaction with sites related to anion transport in human red blood cells. — *J. Membrane Biol.*, 1977, 33, 311—324.
12. *Steck T. L.* The organization of the proteins in the human blood cell membrane. — *J. Cell Biol.*, 1974, 62, 1—19.
13. *Wolosin J. M., Ginsburg H., Cabantchik Z. I.* Functional characterization of anion transport system isolated from human erythrocyte membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 2419—2427.
14. *Zaki L., Fasold H., Schulmann B., Passow H.* Chemical modification of membrane proteins in relation to inhibition of anion exchange in human red blood cells. — *J. Cell Physiol.*, 1975, 86, 471—494.
15. *Zaki L., Ruffing W., Gärtner E., Fasold H., Passow H.* Modification of the protein in band 3 and inhibition of anion transport across the red blood cell membrane by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. — *Biochim. Biophys. Acta* (submitted for publication), 1978.

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ  
ЛЕКАРСТВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ КАК ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ  
ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ХЛОРИДА:  
ВЛИЯНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В КОЛЬЦЕ**

Р. МОТЕ, ДЖ. Л. КУЗЕН  
(R. MOTAIS, J. L. COUSIN)

*Лаборатория клеточной физиологии, факультет естественных наук,  
Парк Вальроз, 06034 Ницца, Франция*

Давно известно, что проницаемость мембран эритроцита для анионов может обратимо ингибироваться по некокурентному механизму большим числом химически разнородных соединений [3, 9, 10]. В концентрациях, вызывающих ингибирование анионной

проницаемости, эти соединения не сказываются на процессе пассивного транспорта катионов. Среди этих ингибиторов имеются анионы, катионы, и нейтральные молекулы. Единственным общим свойством всех этих соединений является их полярно-неполярный характер.

Механизм действия этих ингибиторов еще не выяснен. Однако недавно возникло представление, что белок полосы 3, участвующий в транспорте анионов, может являться местом действия ингибиторных молекул, среди которых есть такие химически различающиеся соединения, как салицилат, динитрофенол, диниридамол, иретанид, фуросемид, этакриновая [12] и нифлуминовая [2] кислоты. Действие таких структурно-неспецифических препаратов не может быть прямо соотнесено с их химическим строением, за исключением того общего соображения, что структура влияет на их физико-химические свойства. В настоящем разделе обсуждается попытка выявить возможную взаимосвязь между физико-химическими свойствами некоторых из перечисленных соединений и их ингибиторными свойствами. Для того чтобы иметь возможность анализировать такую взаимосвязь исходя из количественных терминов, необходимо использовать гомологические ряды соединений, иными словами следует начинать с химического соединения, обладающего известным ингибиторным эффектом, и сравнивать его активность с активностью соединений аналогичной структуры, отличающихся от исходного соединения лишь характером заместителей.

Известно, что салициловая кислота ингибирует анионную проницаемость и что она влияет на взаимодействие специфического анионного ингибитора с белком полосы 3 [12]. Таким образом, салицилаты могут рассматриваться как первый набор изучаемых гомологов. Если введение в кольцо в салициловой кислоте заместителя X приводит к образованию производного с иной ингибиторной активностью, можно предполагать наличие как минимум трех возможных изменений в таком производном, которые могут быть ответственны за наблюдаемый биологический эффект. Может происходить изменение гидрофобности молекулы, изменение распределения электронов в молекуле или появление стерических эффектов за счет того, что пространство, требуемое для заместителя X, превосходит пространство, занимаемое водородом в исходной молекуле. Для исследованных рядов мы обнаружили, что роль стерического параметра практически отсутствует и что количественное описание взаимосвязи структуры и активности соединений может быть дано при учете только электронных и гидрофобных свойств заместителей в наборе однотипных соединений. Электронный эффект заместителей может быть выражен количественно через параметр  $\sigma$ , константу Hammett, а гидрофобный эффект заместителя — через  $\pi$ , константу Hansch, или измерением для всех производных коэффициентов распределения между водой и неполярным растворителем. Соответствующий параметр  $\sigma$  определяется уравнением  $\log k/k_0 = \rho \sigma$ , где  $k$  — константа, характеризую-

щая реакцию замещенного ароматического соединения,  $k_0$  — соответствующая константа для исходного соединения ряда, а  $\rho$  — характеристическая константа реакции. Константа  $\pi$  определяется уравнением  $\pi = \log P_x - \log P_n$ , где  $P_n$  — коэффициент распределения в системе октанол — вода для исходного соединения, а  $P_x$  — соответствующий коэффициент для замещенного производного. Гидрофобные свойства соединений обычно выражаются именно через  $\pi$ : коэффициент распределения в системе октанол — вода, который для многих соединений может быть найден в литературе [6] или рассчитан в соответствии с правилами, сформулированными Leo, Hansch и Elkins [6]. К сожалению, для некоторых производных рассчитанные таким способом коэффициенты не слишком достоверны. Таким образом, гидрофобные свойства указанных соединений нужно определять экспериментально. При этом следует отметить, что определение параметра  $R_M$  методом тонкослойной распределительной хроматографии имеет ряд преимуществ. В табл. 18—20 показатель липидной растворимости —  $R_{M_{H_2O}}$  представляет собой результат измерения коэффициента распределения, эквивалентный  $\log P$  [7]. Для каждого соединения из использованного набора ингибиторная активность определялась экспериментально измерением молярной концентрации ( $I_{50}$ ), вызывающей 50% ингибирование самообмена хлорида в условиях равновесия Доннана; таким образом, эта активность может быть выражена как  $1/I_{50}$ .

Таблица 18. Физико-химические свойства различных салицилатов и их ингибиторное действие в транспорте хлорида

X	$\log \frac{1}{I_{50}}$	$R_{M_{H_2O}}$	$\sigma^*$
H	2,89	0,75	0,00
4-NH <sub>2</sub>	2,50	1,07	-0,66
4-Ацетамидо	2,87	0,48	0,00
5-Cl	3,67	0,94	0,37
5-Br	4,12	1,11	0,39
3,5-Диiod	5,87	1,50	0,70
3,5-Дибром	4,97	1,34	0,78
3,5-Диизопропил	5,75	2,79	-1,10
3,5-Динитро	4,11	0,32	1,42

\* Значения  $\sigma$  взяты из [11].

Данные, полученные для производных салициловой кислоты, приведены в табл. 18. Уравнения 1—3 получены из этих данных с использованием метода наименьших квадратов.

$$\log \frac{1}{I_{50}} = 2,718 + 1,193 R_{M_{H_2O}} \quad \begin{matrix} \pi & \rho & \sigma \\ 9 & 0,696 & 0,953 \end{matrix} \quad (1)$$

$$\log \frac{1}{I_{50}} = 3,783 + 0,933\sigma - 9 0,453 - 1,183 \quad (2)$$

$$\log \frac{1}{I_{50}} = 1,870 + 1,528 R_{M_{H_2O}} + 1,443\sigma - 9 0,969 - 0,355 \quad (3)$$

В приведенных уравнениях  $n$  представляет собой число точек, использованных при расчете констант в уравнениях;  $s$  — стандартное отклонение;  $r$  — коэффициент корреляции. Из уравнений 1—3 следует несколько важных моментов. Уравнения 1 и 2 показывают, что гидрофобный или электронный эффекты заместителей, взятые по отдельности, не объясняют вариаций ингибиторной активности салицилатов, поскольку коэффициенты корреляции малы. С другой стороны, из уравнения 3 следует, что при совместном учете электронного и гидрофобного эффекты заместителей ответственны за 94% изменений ( $r^2 = 0,94$ ). Положительный знак при  $R_{M_{H_2O}}$  указывает, что более липофильный заместитель приведет к получению более активного производного. Положительный коэффициент при  $\sigma$  означает, что заместитель, оттягивающий электроны, делает производное более активным.

Т а б л и ц а 19. Физико-химические свойства различных бензоатов, и их ингибиторное действие в транспорте хлорида

X	$\log \frac{1}{I_{50}}$	$R_{M_{H_2O}}$	$\sigma$
H	1,92	0,88	0,00
2-Метил	1,76	0,98	-0,17
3-Метил	2,83	1,06	-0,07
4-Метил	2,53	1,09	-0,17
2-Хлор	1,75	0,71	0,23
3-Хлор	2,76	1,13	0,37
3-Бром	3,00	1,20	0,39
3-Йод	3,46	1,21	0,35
3,4-Дихлор	3,94	1,72	0,60
2,5-Дихлор	2,56	0,91	0,60
3,4,5-Трийод	6,10	2,18	0,88
3,5-Ди-трет-бутил	6,19	3,14	-0,24
4-Этоксн	2,81	1,31	0,50
3-Ацетамидо	2,36	0,94	0,21
4-Ацетамидо	2,04	0,66	0,00
2-Аптрапилоил	3,04	1,36	0,43

Аналогичные результаты могут быть получены и для производных бензойной кислоты, как это следует из уравнения 4, полученного на основе данных табл. 19:

$$\log \frac{1}{I_{50}} = 0,296 + 1,992 R_{M_{H_2O}} + 0,897\sigma \quad (4)$$

( $n = 16$   $r = 0,965$   $s = 0,376$ )

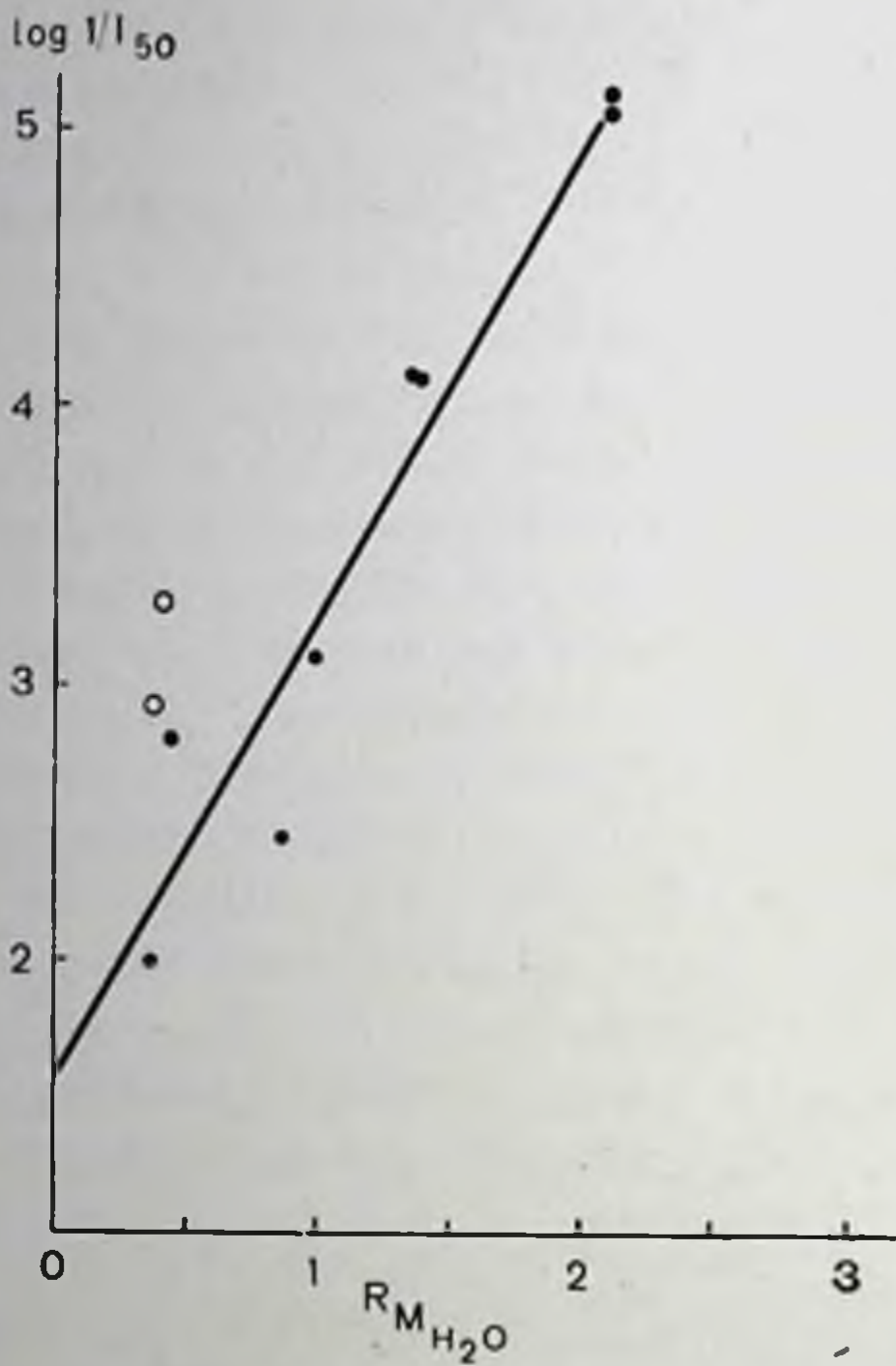


Рис. 78. Относительная ингибиторная активность производных феноксиуксусной кислоты в зависимости от значения  $R_{M_{H_2O}}$  (индекса липорастворимости, эквивалентного  $\log P$ ). Черные кружки — метил-, ацетил- и хлорпроизводные [7], светлые кружки — нитропроизводные. Построено методом наименьших квадратов по данным [7], за исключением данных, относящихся к нитропроизводным.

Уравнение, связывающее  $\log \frac{1}{I_{50}}$  и  $R_{M_{H_2O}}$  имело вид:

$$\log \frac{1}{I_{50}} = 1,54 + 1,71 R_{M_{H_2O}} \quad n = 8 \quad r = 0,96 \quad (5)$$

Поскольку из данных, полученных в экспериментах с салицилатами и бензоатами, следует, что притягивающие электроны группы повышают ингибиторную активность производных, мы решили изучить активность производных феноксиуксусной кислоты, содержащих заместители, дающие сильный отрицательный индуктивный эффект, например  $-\text{NO}_2$ -группы. Были испытаны 2-нитро- и 4-нитрозамещенные феноксиуксусные кислоты. Экспериментальные данные приведены в табл. 20. Из данных рис. 78

Зависимость ингибиторной активности сразу и от электронного и от гидрофобного эффекта заместителей может быть дополнительно проиллюстрирована изучением аналогов этакриновой кислоты, оказывающих диуретическое действие. Недавно [7] мы показали, что ингибиторное действие этакриновой кислоты на транспорт хлорида не связано с реакцией по SH-группам, поскольку дегидроэтакриновая кислота — производное, лишенное способности взаимодействовать с SH-группами, обладает таким же ингибиторным свойством. При изучении набора производных феноксиуксусной кислоты (поскольку этакриновая кислота представляет собой производное феноксиуксусной кислоты) мы показали, что все изученные производные, включая саму феноксиуксусную кислоту, в большей или меньшей степени обладают ингибиторной способностью; более того, относительная активность всех соединений хорошо коррелировала с их жирорастворимостью, как это следует из рис. 78 (чер-



(светлые точки) следует, что новые результаты не согласуются с ранее полученными.

Таблица 20. Физико-химические свойства различных производных феноксиуксусной кислоты и их ингибиторное действие в транспорте хлорида

X	$\log \frac{1}{I_{50}}$	$R_{M_{H_2O}}$	$\sigma$
H	2	0,37	0
3-CH <sub>3</sub>	2,45	0,83	-0,07
4-COCH <sub>3</sub>	2,80	0,45	0,50
4-Хлор	3,10	0,99	0,23
2,4-Дихлор	4,10	1,39	0,46
2,3-Дихлор	4,12	1,36	0,60
2,3-Дихлор-4-COCH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )(CH <sub>3</sub> )	5,05	2,09	1,03
2,3-Дихлор-4-CO(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )(-CH <sub>2</sub> ) (этакриновая кислота)	5,10	2,09	1,03
2-Нитро	2,96	0,40	0,78
4-Нитро	3,27	0,41	0,78

Таким образом, при сравнении уравнения 5 с уравнением 6, также связывающим  $\log \frac{1}{I_{50}}$  и  $R_{M_{H_2O}}$  для соединений, включающих нитропроизводные, видно, что коэффициент корреляции понижается.

В противоположность этому, как показывает уравнение 7, совместное рассмотрение электронных и гидрофобных эффектов заместителей заметно повышает корреляцию (уравнение 7 «объясняет» 97% вариабельности активности производных).

$$\log \frac{1}{I_{50}} = 2,002 + 1,431 R_{M_{H_2O}} \quad n=10 \quad r=0,909 \quad s=0,466 \quad (6)$$

$$\log \frac{1}{I_{50}} = 1,734 + 1,070 R_{M_{H_2O}} + 1,208 \sigma$$

$$n=10 \quad r=0,986 \quad s=0,197 \quad (7)$$

Модификация через введение нитрогрупп показывает, что для серьезного изучения взаимоотношения структуры и активности должен быть использован набор однотипных соединений с самыми разнообразными структурными изменениями.

Другой пример роли электронных эффектов может быть получен при изучении фенольных производных; на рис. 79 приведена зависимость  $\log \frac{1}{I_{50}}$  от  $\sigma$  для хлор- и нитрофенолов. Жирорастворимость нитрофенолов всегда невелика, хотя значения  $\sigma$  могут сильно различаться. Таким образом, наклон кривой, проходящей через точки, соответствующие разным фенолам, примерно указывает степень участия электронного параметра  $\sigma$  в ингибиторной

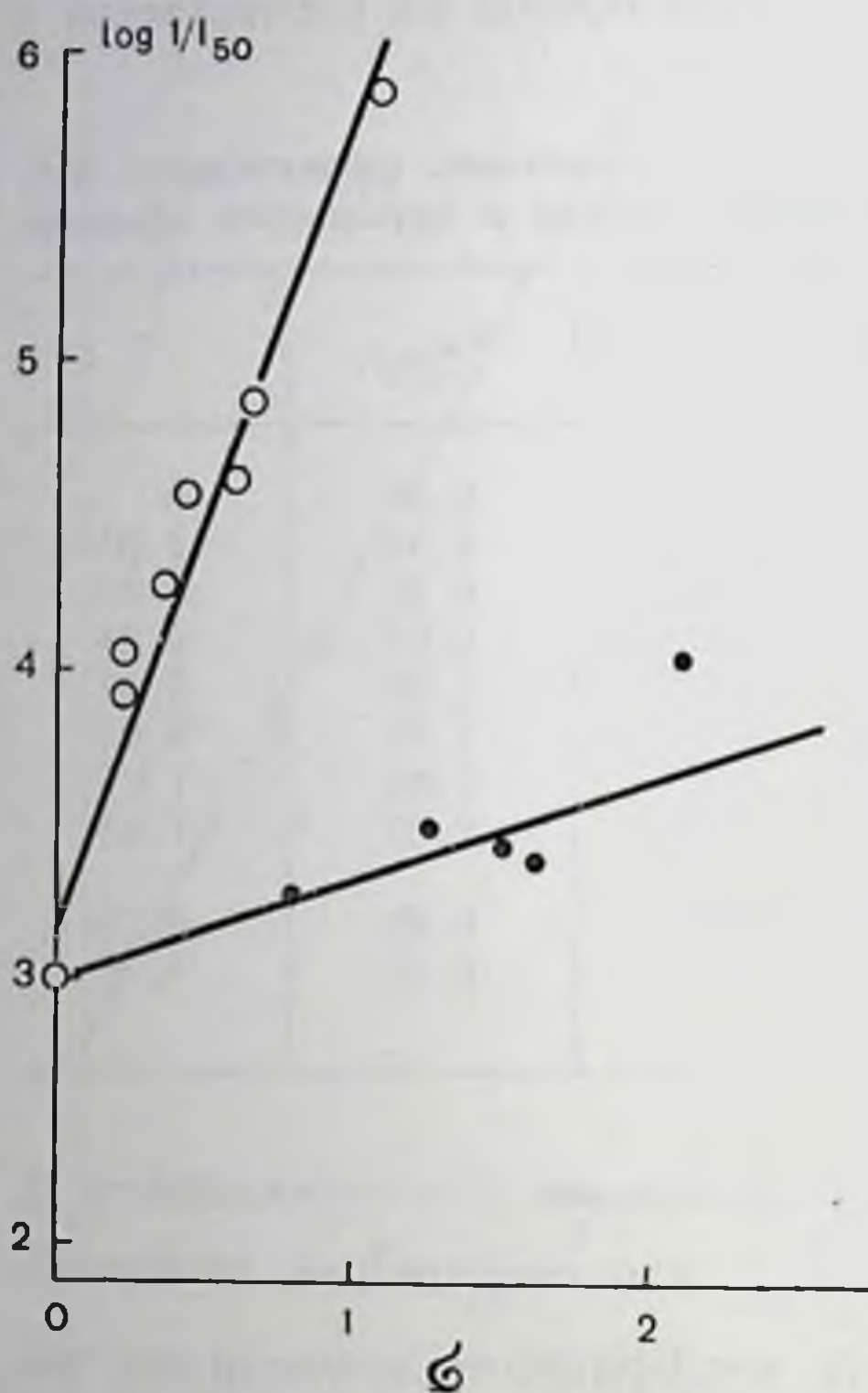


Рис. 79. Взаимосвязь между ингибированием проницаемости для хлорида и константой Гаммета  $\sigma$  заместителя для хлорфенолов (светлые кружки) и нитрофенолов (черные кружки).

Результаты анализа взаимосвязи структуры и активности этих соединений, состоит в том, что ингибиторная активность в большой степени зависит от способности этих соединений к гидрофобному связыванию и от внутримолекулярного распределения электронной плотности: чем больше липофильных и электроноакцепторных заместителей присоединяются к молекуле исходного соединения, тем более активными ингибиторами являются соответствующие производные. Тесная корреляция этих параметров, наблюдаемая даже при использовании объемных заместителей типа 3,5-дитретбутила или 3,5-динизопропила, свидетельствует о незначительной роли стерических эффектов заместителей в кольце. Эффект электроноакцепторных заместителей выражается в наличии более кислой боковой цепи ( $-\text{COOH}$  или  $-\text{OH}$ ), что указывает на возможность электростатического взаимодействия. Если такое взаимодействие вовлечено в реализацию ингибиторного действия, можно предположить, что положительно заряженный компонент мембраны должен быть расположен в непосредственной близости к гидрофобному «карману» или непосредственно в нем. Это

активности. С другой стороны, для хлорфенолов отношение жирорастворимости к  $\sigma$  примерно постоянно и в результате наклон кривой, проходящей через точки, соответствующие различным хлорфенолам, иллюстрирует совместный вклад электронных и гидрофобных эффектов заместителей. Количественный анализ данных, полученных при изучении 16 производных фенола, показывает [8], ингибиторная активность этих соединений хорошо коррелирует и с электронным и с гидрофобным действием заместителей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обратимые ингибиторы транспорта хлорида, изученные в настоящей работе, представляют собой анионные соединения, способные взаимодействовать с белком полосы 3, как это было показано для трех из них: салициловой кислоты, этакриновой кислоты и 2,4-динитрофенола [12].

Наиболее важное заключение, сделанное нами на основании анализа взаимосвязи структуры и активности этих соединений, состоит в том, что ингибиторная активность в большой степени зависит от способности этих соединений к гидрофобному связыванию и от внутримолекулярного распределения электронной плотности: чем больше липофильных и электроноакцепторных заместителей присоединяются к молекуле исходного соединения, тем более активными ингибиторами являются соответствующие производные. Тесная корреляция этих параметров, наблюдаемая даже при использовании объемных заместителей типа 3,5-дитретбутила или 3,5-динизопропила, свидетельствует о незначительной роли стерических эффектов заместителей в кольце. Эффект электроноакцепторных заместителей выражается в наличии более кислой боковой цепи ( $-\text{COOH}$  или  $-\text{OH}$ ), что указывает на возможность электростатического взаимодействия. Если такое взаимодействие вовлечено в реализацию ингибиторного действия, можно предположить, что положительно заряженный компонент мембраны должен быть расположен в непосредственной близости к гидрофобному «карману» или непосредственно в нем. Это

соображение уже выдвигалось на основе относительной активности ряда стильбендисульфокислот [11]. Более того, этот «карман» должен иметь достаточно большие размеры, на что указывает наличие хорошей корреляции ингибиторной активности и гидрофобности заместителя, независимо от его размера или положения в ароматическом кольце, т. е. свободное связывание соответствующего участка молекулы со связывающим центром.

Нас интересовала возможность разделения относительного вклада стерических, электронных и гидрофобных свойств заместителей в активность обратимого ингибитора. Для некоторых рядов ингибиторов, например для производных ацетофенона, включающих флоретин, мы показали [1], что иные специфические факторы объясняют их биологическую активность. При этом интересно отметить, что флоретин не предохраняет систему анионного транспорта от необратимой модификации [12].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cousin J. L., Motais R.* Effect of phloretin on chloride permeability: A structure-activity study. — *Biochim. Biophys.*, 1978, 507, 531—538.
2. *Cousin J. L., Motais R.* Inhibition of anion permeability by amphiphilic compounds in human red cells: Evidence for an effect of niflumic acid on the band 3 protein (submitted for publication), 1978.
3. *Deuticke B.* Anion permeability of the red blood cell. — *Naturwissenschaften*, 1970, 57, 172—179.
4. *Hansch C.* In: *Structure-Activity Relationships*, 1973, v. 1, edited. by C. J. Cavalito. Pragmon Press, Oxford.
5. *Kutter E., Hansch C.* The use of substituent constants in the quantitative treatment of hapten-antibody interaction. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, 135, 126—135.
6. *Leo A., Hansch C., Elkins D.* Partition coefficients and their uses. — *Chem. Rev.*, 1971, 71, 525—616.
7. *Motais R., Cousin J. L.* Inhibitory effect of ethacrynic acid on chloride permeability. — *Am. J. Physiol.*, 1976, 231, 1485—1489.
8. *Motais R., Sola F., Cousin J. L.* Uncouplers of oxidative phosphorylation: A structure-activity study of their inhibitory effect on passive chloride permeability. — *Biochim. Biophys. Acta* (in press), 1978.
9. *Papart A. K.* Permeability of the erythrocyte for anions. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1940, 8, 25.
10. *Passow H., Schell K. F.* Chemical modifiers of passive ion permeability of the erythrocyte membrane. — *Experientia*, 1969, 25, 460—468.
11. *Rothstein A., Cabantchik Z. I., Knauf P.* Mechanism of anion transport in red blood cells: Role of membrane proteins. — *Fed. Proc.*, 1976, 35 (1), 3—10.
12. *Zaki L., Ruffing W., Gärtner E. M., Fasold H., Motais R., Passow H.* Band 3 as site of action of reversibly binding inhibitors of anion transport across the red cell membrane. FEBS Meeting, Copenhagen, 1977 (in press).

#### НАТРИЕВЫЙ КАНАЛ КАК РЕЦЕПТОР ЛЕКАРСТВ

ДЖ. М. РИШЬЕ (J. M. RITCHIE)

Отдел фармакологии, Школа медицины Йельского университета,  
Нью-Хейвен, Коннектикут 06510, США

Фармакологическая активность сакситоксина и тетродотоксина (рис. 80) известна давно [28, 34]. Тетродотоксин представляет собой яд японского иглобрюха и нередко является причиной смер-

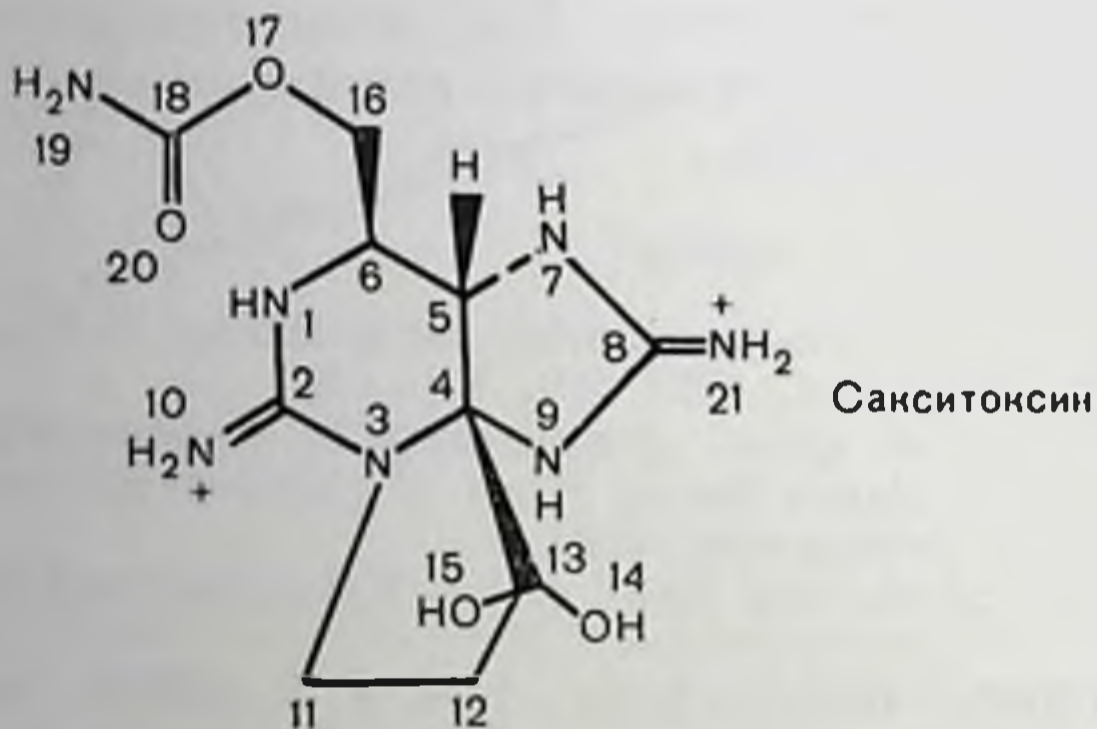
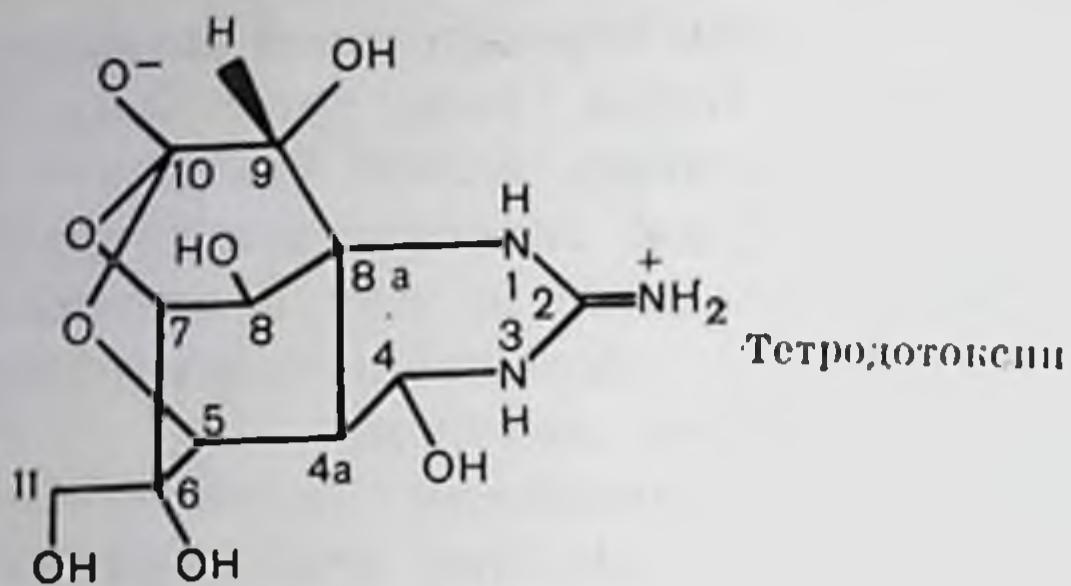


Рис. 80. Структура тетродотоксина и сакситоксина.

димность. Именно это взаимодействие является единственной известной фармакологической реакцией названных соединений.

Одной из проблем, нередко возникающих при изучении взаимодействия лекарство — рецептор, является нелинейность ответа. Так, например, трудно определить непосредственно из силы сокращения гладкой мышцы или из количества секрета железы в ответ на применение лекарства, какая именно часть общего пула рецепторов оказалась им занята. Но в случае токсина и его рецептора в натриевом канале, поскольку, по-видимому, одна молекула токсина блокирует один и только один натриевый канал, степень блокирования рецепторов может быть легко определена в терминах максимальной натриевой проводимости мембраны,  $g_{Na}$ , просто измеряемой по крайней мере в некоторых препаратах. Таким образом можно определить и степень блокирования рецепторов и равновесную константу диссоциации  $K_t$ , которая служит мерой сродства токсина к рецептору. Так, например, Hille [14] в своих экспериментах по фиксации потенциала на миелинизированных волокнах лягушки измерял  $g_{Na}$  как функцию концентрации сакситоксина в инкубационной среде (рис. 81). Сплошная линия представляет собой теоретическую кривую, предсказывающую значение пикового натриевого тока как функции concentra-

тельных отравлений у людей; сакситоксин представляет собой парализующий яд водных панцирных животных, из-за которых происходят периодические вспышки отравлений по всему миру. Но хотя клиническая фармакология этих соединений стара, интерес к ним на молекулярном уровне возник совсем недавно. И действительно, особый интерес к этим двум токсинам начали проявлять не ранее середины 60-х годов [23], когда стало ясно, что их фармакологическое действие основано на способности взаимодействовать даже в чрезвычайно малых концентрациях с натриевыми каналами возбудимых тканей, блокируя прово-

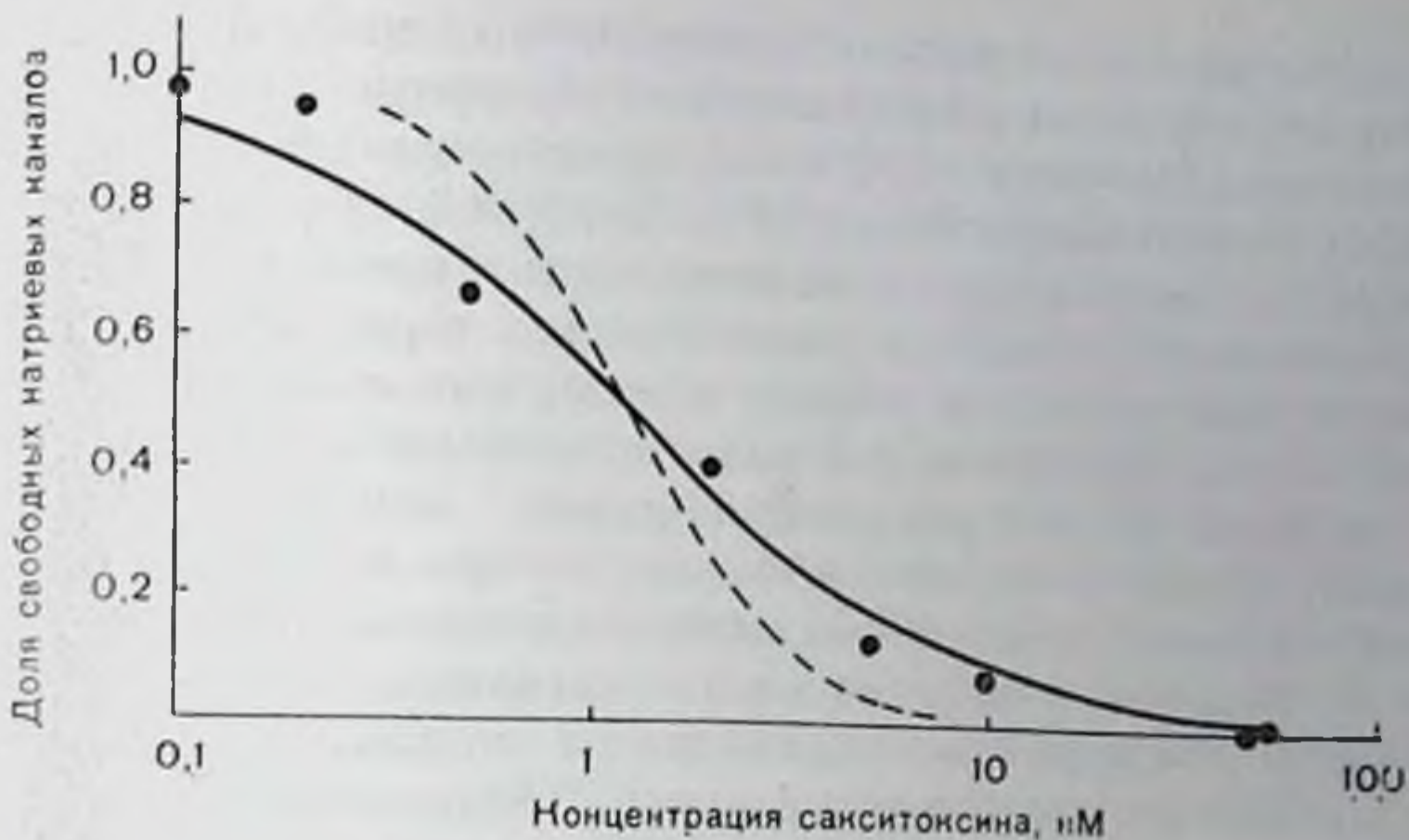


Рис. 81. Кривая доза — ответ для сакситоксина.

Ордината — максимальная натриевая проводимость (по отношению к проводимости в нормальном растворе Рингера) при различных концентрациях сакситоксина. Сплошная линия — теоретическая кривая доза — ответ, построенная в допущении, что для вызова определенного частичного дискретного ингибирования требуется обратимое связывание одной молекулы сакситоксина с рецептором. Пунктирная линия — соответствующая теоретическая кривая, построенная в предположении, что с каждым рецептором должны связываться две молекулы сакситоксина [14].

ции сакситоксина (отложенной на логарифмической шкале), если предположить, что одна молекула токсина будет обратимо связываться с рецептором, вызывая потерю определенной доли натриевой проводимости. Очевидно, что экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретическими. С другой стороны, если для того чтобы вызывать блокаду, с каждым рецептором должны связаться две молекулы токсина, наклон теоретической кривой в средней точке должен быть значительно круче (пунктирная линия). Заметим, что концентрация токсина, при которой натриевый ток понижается наполовину (т. е. равновесная константа диссоциации  $K_i$ ), очень мала, составляя величину порядка 1 нМ. В экспериментах на нерве кальмара Cuervo и Adelman [9] пришли к такому же выводу. Именно эта исключительно высокая аффинность в сочетании с уникальной специфичностью в отношении проводящей системы и относит два названных токсина к наиболее сильным среди известных небелковых ядов.

Взаимодействия между рецепторами и лекарствами, включающие эти токсины в натриевый канал, могут изучаться при помощи техники фиксации потенциала. Таким образом, можно изучать не только сами эти взаимодействия, но и различные влияющие на них факторы. Альтернативным подходом может явиться изучение связывания этих токсинов с возбуждаемыми мембранами. Подобные химические эксперименты из соображений практического удобства лучше всего проводить на препаратах, в которых на единицу массы ткани приходится большое количество мембран. Это исключает возможность использования общепринятых объектов электрофизиологических нервных волокон и гигантских аксо-

нов беспозвоночных — из-за относительного небольшого количества ассоциированных с ними мембран. Например, гигантский аксон кальмара (диаметр 500 мкм) имеет площадь аксональной мембраны только около  $80 \text{ см}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ . С другой стороны, блуждающий нерв кролика состоит из немиелинизированных С-волокон гораздо меньшего размера и имеет поэтому гораздо более высокое отношение поверхности к объему массы, составляющее порядка  $6000 \text{ см}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ , а обонятельный нерв панцирной рыбы, состоящий из мельчайших периферических первичных волокон (0,25 мкм в диаметре), имеет то же соотношение порядка  $65000 \text{ см}^2 \cdot \text{г}^{-1}$  [32].

Неопределенность изучения процессов связывания вносит возможность того, что лекарство может захватываться дополнительно каким-то компонентом, отличным от популяции рецепторов, определяющих физиологический ответ. Убедительным доказательством того, что центры связывания одновременно являются физиологически значимыми рецепторными центрами, может стать обнаружение связывающего компонента, имеющего такую же равновесную константу диссоциации, которая будет определена независимым образом из данных по физиологическому действию лекарства. К сожалению, небольшая величина волокон, использованных в химических экспериментах, делает неэффективной технику фиксации потенциала, так что необходимо определять значение  $K_t$  более косвенными методами, чем фиксация потенциала, обычно применяемая при работе с нервами лягушки или кальмара. Однако, хотя метод фиксации потенциала и не может быть использован для маленьких С-волокон, значение  $K_t$  можно определить с помощью модели эффекта изучаемых токсинов на С-волокна, основанную на принципе независимости и на теории распространения импульса Hodgkin — Huxley [5]. Подобные эксперименты вместе с изучением кинетики взаимодействия тетродотоксина с натриевым каналом показали, что значение равновесной константы диссоциации для токсинов в С-волокнах млекопитающих действительно совпадает с определенным более косвенным путем, в частности электрофизиологически, для волокон лягушки и кальмара. Позволяет ли это нам идентифицировать препараты мелких волокон как связывающие компоненты, обладающие равновесной константой диссоциации порядка нескольких наномолей?

### ВКЛЮЧЕНИЕ САКСИТОКСИНА И ТЕТРОДОТОКСИНА НЕРВОМ И МЫШЦЕЙ

В основе определения параметров включения сакситоксина и тетродотоксина лежит биологический метод. Определенное количество ткани инкубируют с соответствующей концентрацией токсина, после чего биологическим методом устанавливают количество несвязавшегося токсина в удаленной инкубационной среде. Однако подобные эксперименты обычно затруднительны, а иногда и вообще невозможны. Важный вклад в эту проблему был сделал Hafemann [11], показавшим, что тетродотоксин может быть поме-

чен тритием по методу Wilzbach. Это открыло возможность проведения различных экспериментов по связыванию тетродотоксина и сакситоксина. В соответствии с обычно применяемым модифицированным методом Wilzbach [10] токсины подвергают действию газообразного трития в поле высокого напряжения. Однако это приводит к заметному разложению токсины и образующиеся в результате примеси трудно отделяются от самого меченого токсина. Вторая возможность появилась с введением нового метода мечения сакситоксина [33], основанном на том факте, что метиленовые водороды в положении 12 сакситоксина (см. рис. 80) обмениваются с водородами воды. Этот обмен в значительной степени зависит от температуры и протекает с константой скорости порядка нескольких часов или менее при 50° С, тогда как константа скорости при 0° С составляет около 6 мес [30]. Таким образом, токсины может быть помечен взаимодействием с тритированной водой при высоких температурах (50° С), после чего его хранят и используют в эксперименте при низких температурах: —70° и 2° С соответственно. Этот способ позволяет получать препараты меченого токсина с высокой удельной радиоактивностью,

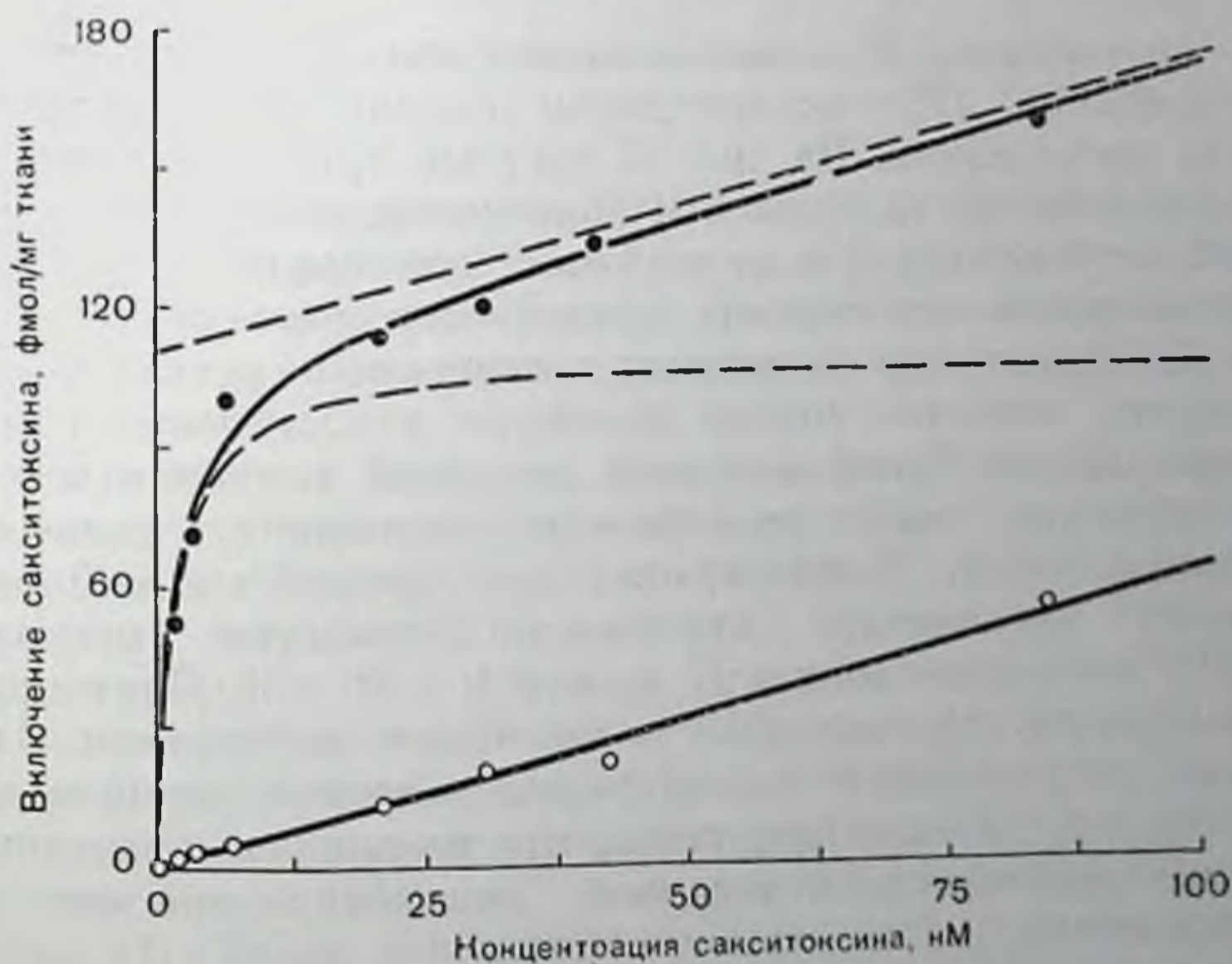


Рис. 82. Включение меченого сакситоксина немиелинизированными волокнами блуждающего нерва кролика.

Пунктирная прямая линия представляет собой асимптоту кривой связывания. Суммарная кривая соответствует соотношению:

$$U = \text{Сакситоксин}_{\text{связанный}} = \frac{0,65 [\text{сакситоксин}] + 110 [\text{сакситоксин}]}{1,8 + [\text{сакситоксин}]}$$

где U дана фмол/мг ткани, а сакситоксин — в нМ. Линейная и насыщаемая компоненты (гиперболическая пунктирная линия) даны раздельно. Кривые связывания построены по методу наименьших квадратов на основе точек, полученных в присутствии различных концентраций меченого сакситоксина (черные кружки) и в присутствии различных концентраций меченого сакситоксина и 10 мкМ немеченого тетродотоксина (светлые кружки) [33].

процедура мечения относительно проста; кроме того, практически отсутствуют примеси за счет разложения токсина. Дальнейшее развитие метода стало возможным благодаря разработке полного стереоспецифического синтеза d,l-сакситоксина [38]. Таким образом, в настоящее время, по крайней мере в принципе, можно получать стабильный радиохимический чистый меченый сакситоксин, обладающий высокой специфической активностью.

Кривые включения меченого по методу обмена сакситоксина были получены для различных препаратов [32]: на немиелинизированных волокнах блуждающего нерва кролика, ноги омара и обонятельного нерва панцирной рыбы, на гигантских аксонах кальмара, на миелинизированных нервах амфибий и млекопитающих, а также на мышцах амфибий и млекопитающих. Во всех случаях кривые связывания имеют одинаковый общий вид (рис. 82): суммарный захват состоит из линейной ненасыщаемой компоненты и насыщаемой гиперболической компоненты. Таким образом, суммарное включение (темные кружки)  $U$  выражается в виде формулы:

$$U = \frac{b[T] + M[T]}{[T] + [K_1]}, \quad (1)$$

где  $b$  — постоянная;  $M$  — максимальная насыщаемая связывающая способность;  $[T]$  — концентрация токсина;  $K_1$  — равновесная константа диссоциации. На рис. 82 светлые кружки демонстрируют эффект добавления большого количества немеченого токсина (10 мкМ тетродотоксин) в инкубационную среду. Это большое количество немеченого токсина практически полностью ингибирует по конкурентному механизму насыщаемый захват меченого сакситоксина, оставляя только линейную ненасыщаемую компоненту связывания. Вычитание этой линейной компоненты из общего включения дает насыщаемую компоненту связывания (пунктирная линия). Концентрация, при которой эта компонента насыщается наполовину, для всех изученных препаратов (табл. 21) составляет величину между 1 и 10 пМ. Значения  $K_1$ , определенные из экспериментов по изучению связывания, близки значениям, полученным в электрофизиологических экспериментах. Таким образом, разумно допустить, что насыщаемая компонента связывания действительно отражает связывание токсина с натриевым каналом.

Проведенные эксперименты по связыванию ясно указывают, что во всех случаях (за исключением миелинизированных волокон, см. ниже) натриевые каналы распределены по поверхности клеточной мембраны очень редко. В обонятельном нерве панцирной рыбы например, значение  $M$  377 фмол/мг соответствует плотности каналов в  $35 \text{ мкм}^{-2}$  (см. табл. 21). Если каналы распределены на плоской поверхности мембраны, то они будут находиться друг от друга на расстоянии 0,2 мкм или один канал приходится на площадь  $3 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$ . Поскольку площадь, занимаемая молекулой фосфолипида на мембране, составляет  $0,5 \text{ нм}^2$ , то один нат-



Таблица 21. Связывание сакситоксина с возбудимыми тканями

	К, нм	М, фмол/мг	Каналы, число мкм <sup>-2</sup>
Нервы			
Немиелинизированные:			
кролик	1,8	110	110
омар	8,5	94	90
панцирная рыба	9,8	377	35
кальмар ( <i>forbesi</i> )	—	—	550
кальмар ( <i>pealii</i> )	3,8	—	170
Миелинизированные:			
лягушка	5,3	3,1	—
кролик	1,3	17	12 000
Мышцы			
Портижная:			
<i>R. temporaria</i>	5,0	22	380
<i>R. pipiens</i> (южн.)	4,7	25	340
<i>R. pipiens</i> (сев.)	2,7	14	200
Диафрагмальная:			
крыса	3,8	25	210

риевый канал приходится на 60 000 молекул фосфолипидов. Следовательно, они распределены настолько редко, что даже если канал и окажется ассоциирован с частицей на изображении, полученном методом замораживания-скалывания, его будет очень сложно различить.

Эксперименты с мышцами показали (см. табл. 21), что плотность каналов в определенной ткани не обязательно точно фиксирована. Так, например, Almers и Levinson [1], работая с портижной мышцей лягушки *Rana temporaria* и используя меченый тетродотоксин, нашли, что величина *M* составляет 380 мкм<sup>-2</sup>. Jaimovich, Venosa, Shrager и Horowicz [22], проводя эксперименты на лягушке *Rana pipiens* и используя биологический метод определения включенного тетродотоксина, установили, что величина *M* составляет около 340 мкм<sup>-2</sup>, т. е. хорошо согласуется с другими данными [1]. Такое совпадение, однако, не является правилом. Так были изучены [29] мышцы двух вариаций того же самого вида *Rana pipiens*. Эксперименты проводили одновременно, в одинаковых условиях и с тем же образцом меченого сакситоксина. Было обнаружено, что связывающая способность портижных мышц южного подвида составляла порядка 25 фмол на 1 мг ткани, тогда как для более мелкого северного подвида — около 14 фмол/мг. Поскольку различия в размерах волокон были невелики, полученные данные соответствуют плотности каналов в 350 и 200 мкм<sup>-2</sup> соответственно. Это означает, что не следует ожидать совпадения результатов, полученных исследователями,

работающими с различными видами и использующими разные препараты токсинов.

Помимо этого, важным может оказаться и физиологическое состояние ткани. Например, в мышцах нормальной крысы (см. табл. 21) максимальная связывающая способность составляет около 25 фмол/мг. В результате денервации мышцы это значение уменьшается на  $1/3$ . Следует заметить, однако, что понижение этого значения в денервированных мышцах не так выражено, как повышение числа чувствительных к ацетилхолину каналов, которое также наблюдается в результате денервации: связывание  $\alpha$ -бунгаротоксина, служащее мерой количества чувствительных к ацетилхолину центров, возрастает на 40—50 фмол/мг [4]. Итак, из чисто количественных соображений кажется маловероятным иногда предполагаемое превращение нормальных натриевых каналов (с потерей чувствительности к тетродотоксину и сакситоксину) в чувствительные к ацетилхолину каналы в результате денервации. В действительности реального изменения в плотности каналов вообще может не происходить, поскольку одним из общеизвестных эффектов денервации является набухание мышц на 30—50% [37]. Именно это набухание, а не уменьшение числа натриевых каналов может быть причиной пониженного числа каналов на единицу массы [29].

## ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТОКСИНА С РЕЦЕПТОРОМ

### Конкуренция с другими катионами

Если токсин взаимодействует с рецептором с образованием комплекса токсин — рецептор и если рецептор взаимодействует также с другим веществом (рассматриваемым в этом случае как ингибитор), тогда в присутствии этого ингибитора вследствие конкуренции за рецептор насыщающий захват токсина, обозначаемый обычно выражением:

$$U_0 = \frac{M \cdot [T]}{[T] + [K_1]}, \quad (2)$$

будет иметь другое значение:

$$U_1 = \frac{M \cdot [T]}{[T] + K_1(1 + [I]/K_i)}, \quad (3)$$

где ( $I$ ) представляет собой концентрацию ингибитора,  $K_i$  — равновесную константу диссоциации ингибитора с рецептора в натриевом канале, т. е. кажущаяся равновесная константа диссоциации для токсина возрастет в  $(1 + [I]/K_i)$  раз. Поскольку кажущаяся равновесная диссоциация токсина может быть измерена экспериментально, а концентрация ингибитора известна, то может быть

определено и сродство ингибитора к рецептору в натриевом канале.

Как показали основанные на этом подходе эксперименты, местные анестетики, батрахотоксин и вератридин, по-видимому, не взаимодействуют с тем же центром в натриевом канале, что и токсины [3, 12]. Однако ряд катионов металлов влияет на связывание сакситоксина и тетродотоксина. Для таких катионов были рассчитаны кажущиеся константы связывания с рецептором [13]. Кажущаяся равновесная константа диссоциации для трехвалентных катионов мала (менее 1 мМ), что указывает на очень высокое сродство катиона к рецептору. Для двухвалентных катионов это сродство относительно невелико и соответствующая кажущаяся равновесная константа диссоциации составляет 20—40 мМ, тогда как для различных одновалентных катионов (за исключением таллия) сродство очень мало и значения  $K_i$  составляют величины порядка сотен и тысяч миллимолей. Эти данные хорошо согласуются с результатами электрофизиологических экспериментов по методу фиксации потенциала [17, 39], в которых показано, что кальций и таллий понижают натриевые токи в такой степени, которой соответствует их связывание с рецептором в натриевом канале с равновесной константой диссоциации порядка 20—30 мМ. Кроме того, эксперименты по связыванию [13] и электрофизиологические эксперименты [39] показывают, что ионы водорода понижают натриевые токи за счет протонирования центра связывания в натриевом канале с  $pK_a$  5—6. На основании этого был сделан вывод, что в натриевом канале имеется центр связывания катионов металлов, с которым и связываются токсины [13].

### Заряд поверхности

Хотя действие катионов на изученные химические и электрофизиологические параметры может быть просто объяснено конкуренцией за рецептор, может быть предложено и альтернативное объяснение. Большинство биологических мембран заряжено отрицательно, вследствие чего концентрация любой заряженной молекулы в прилегающем к мембранному рецептору пространстве будет не той же, что в растворе, и связана с последней уравнением Больцмана:

$$[T]_r = [T]_b \cdot e^{-zF\psi/RT}, \quad (4)$$

где  $[T]_r$  и  $[T]_b$  представляют собой концентрации токсина вблизи рецептора и в растворе соответственно;  $\psi$  — поверхностный потенциал;  $z$  — валентность,  $F$ ,  $R$  и  $T$  имеют обычные значения. При таком объяснении кальций должен действовать за счет понижения поверхностного потенциала вследствие экранирования поверхностного заряда, которое должно приводить к понижению концентрации токсина в непосредственной близости от рецептора. Эксперименты по изучению действия кальция на связывание сакситоксина и тетродотоксина показали, что оно происходит в

действительности [13, 32]. На это указывает, в частности, тот факт, что, как и следовало ожидать на основании уравнения 4, связывание двухвалентного сакситоксина значительно более чувствительно к повышению концентрации кальция, чем связывание одновалентного тетродотоксина. Эксперименты по фиксации потенциала в перехватах Ранвье [20] также подтверждают предложенную схему. Кривые ток — напряжение, полученные на узлах Ранвье лягушки в контролируемых условиях инкубации в среде, содержащей 2 мМ кальция, и затем в тех же условиях, но при концентрации кальция 20 мМ, показали, что определенные в обоих случаях экспериментально концентрации тетродотоксина и сакситоксина, в присутствии которых натриевый ток понижается наполовину, в присутствии кальция изменяются таким образом, что соответствующие константы равновесной диссоциации для обоих токсинов, составлявшие 1,5 нМ в нормальном растворе Рингера, резко повышаются в присутствии высоких концентраций кальция. Если бы имела место простая конкуренция, то кажущаяся константа равновесной диссоциации для обоих токсинов  $K_1$  должна была бы измениться в одинаковое количество раз. Вместо этого (в соответствии с результатами, полученными в экспериментах по связыванию) кажущаяся константа равновесной диссоциации для тетродотоксина возросла в 1,34 раза, а для сакситоксина — в 1,87 раз, т. е. намного сильнее. Эти результаты соответствуют абсолютно различным значениям равновесной константы диссоциации  $K_1$  для кальция, которая будет составлять 51 мМ, если основываться на результатах, полученных с тетродотоксином, и 19 мМ, если основываться на результатах, полученных с сакситоксином. Однако если те же самые результаты объяснить только с точки зрения изменения поверхностного потенциала, то находит простое истолкование факт более сильного влияния кальция на связывание двухвалентного сакситоксина, чем одновалентного тетродотоксина, а результаты обоих экспериментов соответствуют изменению поверхностного потенциала на близкую величину порядка 7,2—7,6 мВ.

Описанные эксперименты не исключают возможность обычной конкуренции между катионами металлов и токсинами, но подчеркивают и важность изменений поверхностного потенциала. Следует сделать два замечания, касающихся влияния поверхностного потенциала. Во-первых, некоторые эффекты, по-видимому, относятся к общим изменениям плотности заряда на мембране, тогда как другие эффекты вызываются более специфическими локальными изменениями заряда в непосредственной близости от натриевого канала [15, 26]. Во-вторых, эффекты поверхностного потенциала, которые опосредуются локальными изменениями концентрации токсина, отличаются от эффектов, вызываемых трансмембранным потенциалом. Вызываемое последним зависящее от напряжения связывание токсина [2] отражает преимущественно его прямое влияние на взаимодействие токсина — рецептор.

## ПРИРОДА ЛИНЕЙНОЙ КОМПОНЕНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ

Нередко утверждалось, что линейное связывание токсина с возбуждаемыми мембранами отражает захват примесей [1, 22, 24] и что в экспериментах с немеченым тетродотоксином подобного линейного захвата не наблюдалось. Такие утверждения удивляют, поскольку для других систем известно существование неспецифического связывания различных лигандов [8]. Более того, вследствие фиксированного отрицательного заряда биологических мембран можно ожидать, на основании чисто теоретических положений, что в непосредственной близости от мембраны должно проходить заметное накопление любого катиона, в особенности двухвалентного, каким является сакситоксин. При низких концентрациях токсина, используемых в биологических экспериментах, это должно выражаться в появлении линейной компоненты связывания. Экспериментальное доказательство того, что линейное связывание двух токсинов действительно существует, приведено на рис. 83, где темные точки показывают захват меченого сакси-

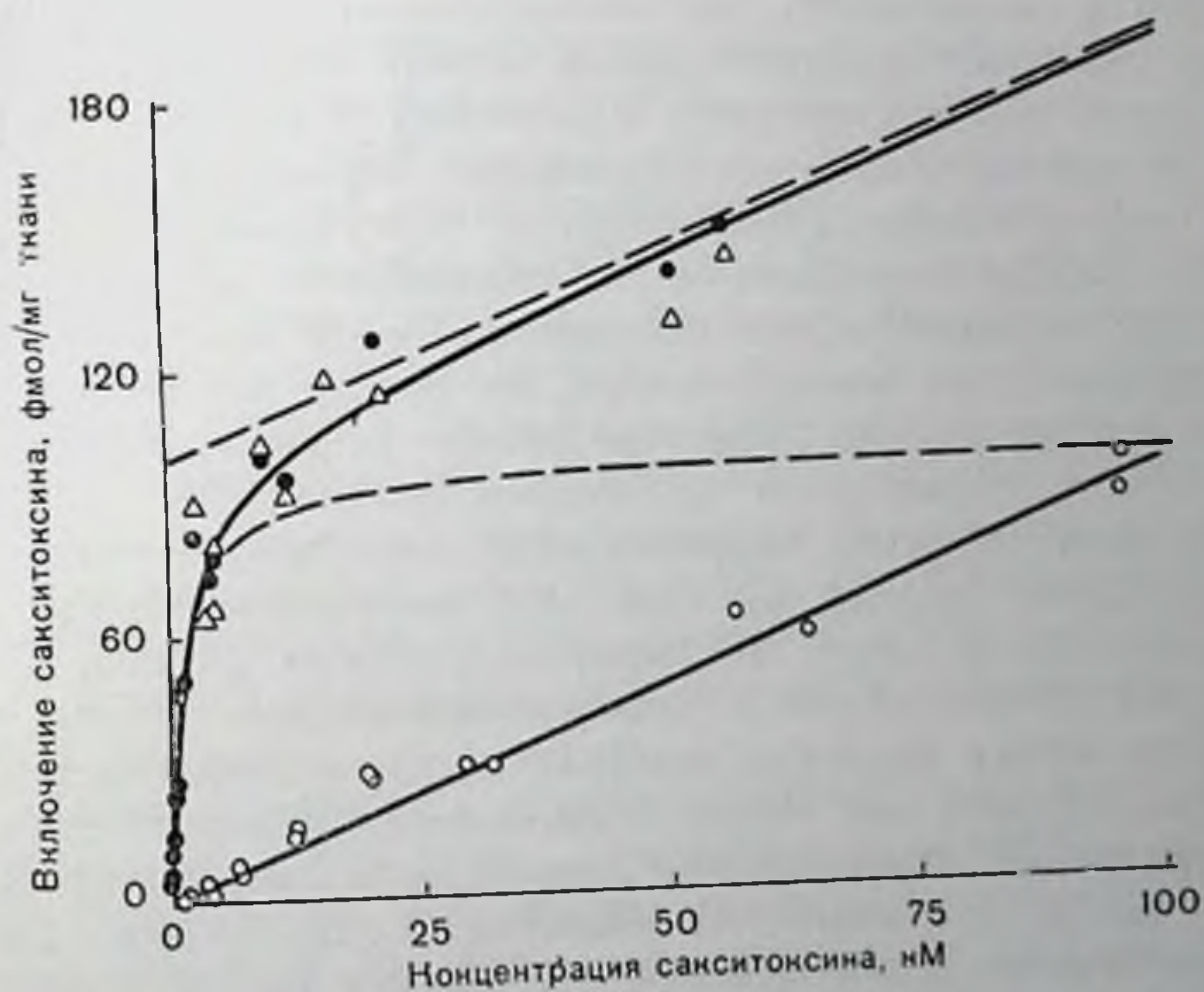


Рис. 83. Включение меченого сакситоксина гомогенизированным мозгом кролика при различных внешних концентрациях токсина, определенное биологическим методом (светлые треугольники) и по радиоактивности (светлые и черные кружки).

Количество захваченной радиоактивности пересчитано в количества токсина на основе значения удельной радиоактивности  $66 \text{ икп/мин}$  на  $\text{фмол}^{-1}$  сакситоксина. Пунктирная прямая линия представляет собой асимптоту кривой связывания. Суммарная кривая соответствует соотношению:

$$U = \text{Сакситоксин}_{\text{связанный}} = \frac{0,95 [\text{сакситоксин}] + 99,3 [\text{сакситоксин}]}{1,5 + [\text{сакситоксин}]}$$

где  $U$  дана в  $\text{фмол/мг ткани}^{-1}$ , а сакситоксин — в  $\text{нМ}$ . Линейная и насыщаемая компоненты (гиперболическая пунктирная линия) даны отдельно. Кривые связывания построены методом наименьших квадратов на основе точек, полученных в присутствии различных концентраций меченого сакситоксина (черные кружки) и в присутствии различных концентраций меченого сакситоксина и  $10 \text{ мкМ}$  немеченого тетродотоксина (светлые кружки).

токсина гомогенатом мозга кролика. Отчетливо видны обычные линейная и насыщаемая компоненты. Как и на рис. 82, в присутствии большого избытка немеченого тетродотоксина (светлые точки) остается только линейная компонента. При вычитании ее из кривой суммарного захвата получается пунктирная линия, характеризующая только насыщаемую компоненту. В этом эксперименте токсин, оставшийся в растворе после инкубации с мозгом, определяли биологическим методом. По количеству «недостающего» токсина в этих экспериментах было определено количество захваченного токсина как функция концентрации сакситоксина. Если действительно линейная компонента связывания отражает захват загрязнений, образовавшихся в процессе реакции мечения, можно ожидать, что захват токсина, определенный биологическим методом, будет выражаться пунктирной линией, отражающей только насыщаемую компоненту. Однако точки, определенные биологическим методом (треугольники), ложатся на кривую, описывающую суммарный захват, определенный в экспериментах с использованием радиоактивного токсина. Таким образом, трудно не прийти к заключению, что значительная часть линейной компоненты отражает действительный захват меченого токсина [30]. Эту гипотезу легко проверить. Поскольку в сахарозном растворе Локе, где экранирование отрицательных зарядов мембраны минимально, можно ожидать выраженную аккумуляцию токсина под действием заряда поверхности, а в кальциевом растворе Локе, где весь натрий заменен двухвалентными ионами кальция, экранирование должно быть значительным, во втором случае должен наблюдаться пониженный линейный захват токсина. И действительно, это было обнаружено экспериментально [30]. Более того, даже величина эффекта количественно совпадала с тем, чего следовало ожидать, исходя из известной плотности заряда на мембране нервного волокна. Кальцийсодержащий раствор Локе понижает линейный захват в гомогенизированном мозге кролика на  $\frac{1}{3}$ . Суммарная площадь мембран в гомогенизированном мозге неизвестна. Однако для обонятельного нерва панцирной рыбы, где неспецифическая связывающая способность составляет 0,6 фмол на 1 мг ткани, эта величина известна. Если предположить, что данная величина также должна понизиться на  $\frac{1}{3}$  в кальциевом растворе Локе, как это наблюдалось для мозга кролика, можно рассчитать, что количество линейно связанного токсина в таком растворе при внешней концентрации сакситоксина 1 нМ должно составлять около 0,2 фмол/мг. С учетом того, что площадь аксонов равна  $65 \text{ см}^2/\text{мг}$  и примерно такое же количество связывающих мембран находится в периаксональном пространстве, один ассоциированный с сакситоксином положительный заряд будет приходиться на  $50 \text{ мкм}^2$  мембраны. Однако в кальциевом растворе Локе (где концентрация кальция составляет 0,117 М) каждая молекула сакситоксина и каждый ион кальция, будучи двухвалентными, участвуют в отражении примерно одинаково. Таким образом, суммарный отрицательный заряд, уравновешенный кальцием,

будет составлять  $0,117/10^{-9}$ , т. е. в  $10^8$  раз выше, чем уравновешенный сакситоксином. Отсюда суммарный избыточный заряд катионов, или суммарный отрицательный заряд, будет равен 1 на  $5 \text{ нм}^2$ , что очень близко к значениям, полученным Schaut [35] и Neumcke [26] для перва.

Итак, соображение о том, что фиксированные заряды на мембранах нервной ткани будут экранироваться ионами в инкубационной среде, приводит к теоретическому обоснованию наличия линейной связывающей компоненты для любого катионного лекарства, особенно в случае двухвалентных катионов типа сакситоксина. Это теоретическое предположение подтверждается экспериментально.

### ЧТО ПОКАЗЫВАЮТ ЭКСПЕРИМЕНТЫ С САКСИТОКСИНОМ И ТЕТРОДОТОКСИНОМ О ФИЗИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ НАТРИЕВОГО КАНАЛА?

#### Размер канала

Из данных по изучению проницаемости различных органических и неорганических катионов Hille [16] сделал вывод, что часть натриевого канала представляет собой пору размером  $0,3 \cdot 0,5 \text{ нм}$ . Катионы с площадью поперечного сечения меньше размеров канала проходят через него, а катионы с большей площадью поперечного сечения через канал не проходят. Из данных о сродстве изученных токсинов к натриевому каналу был сделан вывод, что пора размером  $0,3 \times 0,5 \text{ нм}$  окружена 6 атомами кислорода [16] и что она находится на дне камеры величиной  $0,9 \times 1 \text{ нм}$ , расположенной на внешней стороне мембраны [18]. Соображения о том, каким именно образом изученные токсины блокируют проводимость поры, иллюстрирует рис. 84: оба токсина точно входят в канал, особенно сакситоксин, чем можно объяснить его большее сродство к каналу.

Связывание токсинов с натриевыми каналами может быть использовано для выяснения молекулярной природы канала по меньшей мере двумя способами. Во-первых, высокое сродство токсина к каналу и тот факт, что химическая структура обоих токсинов в настоящее время известна, дают определенную информацию о природе химического строения связывающего центра в канале [16]. Во-вторых, определяя максимальную насыщаемую связывающую способность ткани, можно установить число натриевых каналов на единицу площади мембраны. В сочетании с данными о мембранной проводимости, полученными в результате электрофизиологических экспериментов, это дает возможность рассчитать проводимость индивидуального канала. Последнее важно, поскольку позволяет установить ограничения физической природы канала. Например, большая проводимость канала, по-видимому, исключает возможность существования канала маленьких размеров. К сожалению, в мышцах лягушки определенная плотность

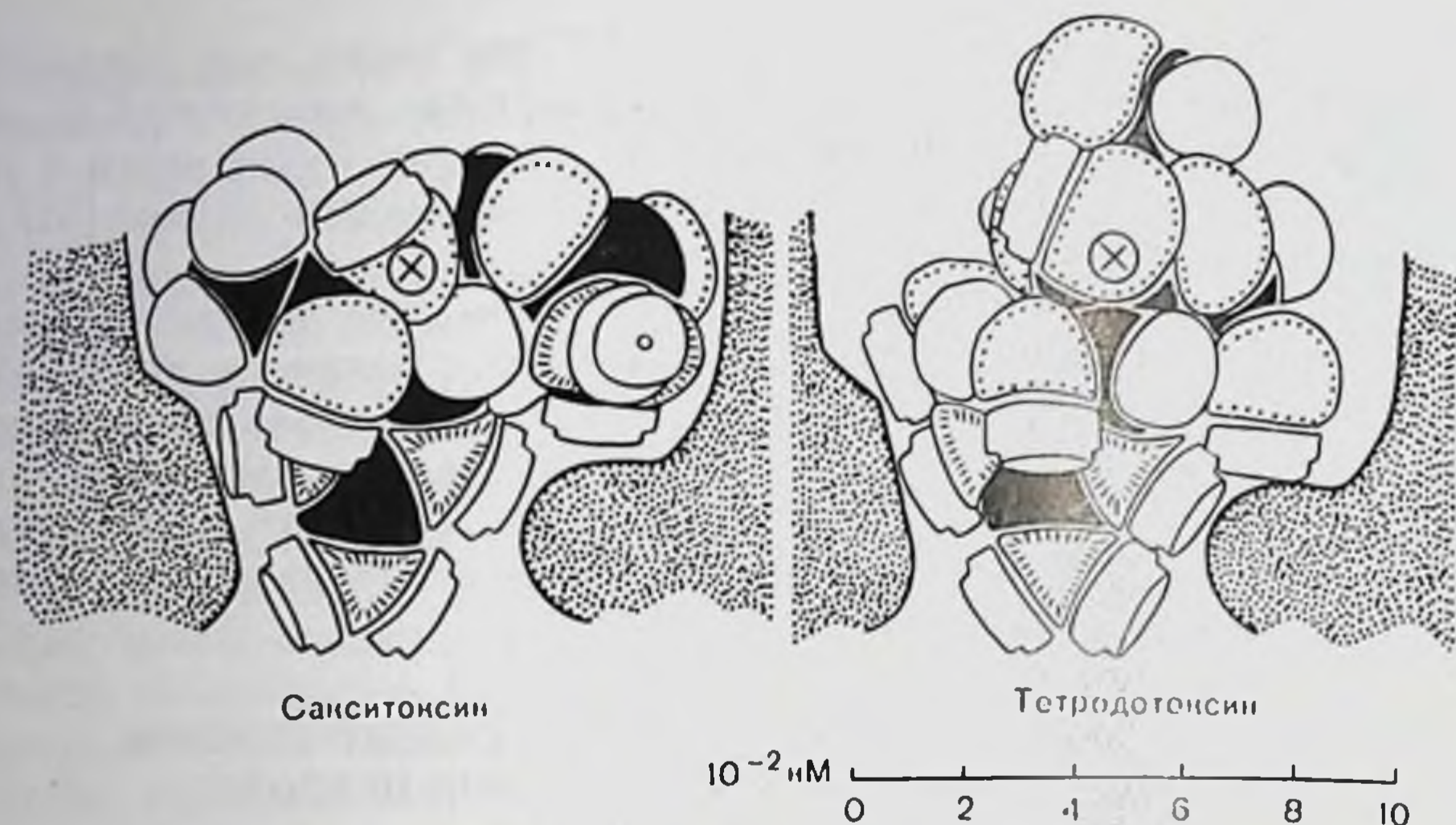


Рис. 84. Сакситоксин и тетродотоксин на рецепторе.

В токсинах атомы углерода — черные, водорода — белые, кислорода отмечены точками по границе, азота — штрихами по границе. Темные области представляют сакситазное сечение рецептора с расположенным в нижней его части «фильтром» узкой селективности. Большая часть рецептора способна к образованию водородных связей, а «фильтр» селективности дополнительно несет отрицательный заряд. Знак X в кружке, расположенный в обоих случаях одинаково относительно рецептора, обозначает оксигруппу, связанную с необычно электроположительным атомом углерода [18].

каналов варьирует от 200 до 400  $\text{мкм}^{-2}$  в зависимости от вида (см. табл. 21). Существует также значительное разногласие в имеющихся данных о мембранной проводимости мышц лягушки — от 50  $\text{pS}/\text{см}^2$  [21] до более 300  $\text{pS}/\text{см}^2$ . Эти два набора цифр позволяют сказать с учетом имеющейся неопределенности, что проводимость индивидуального канала в мышце лягушки составляет, вероятно, более 1,5  $\text{pS}$ , но менее 15  $\text{pS}$ , причем даже эти величины следует рассматривать как приближенные и дающие лишь порядок величины.

### Особая природа узловых мембран

В наиболее возбудимой из всех изученных тканей плотность каналов мала, причем, по-видимому, даже настолько, что это делает невозможным изучение каналов с помощью электронной микроскопии методом замораживания-скалывания. Единственное исключение, однако, представляет узловая мембрана, особые электрофизиологические характеристики которой (высокая скорость проведения) могут отражать ее необычное физическое строение. Данные об измерении входного тока и мембранных шумов в изолированных миелинизированных волокнах лягушки указывают, что плотность натриевых каналов в подальной мембране значительно выше: на 1—2 порядка, чем в мышце или в немиелинизированных нервных волокнах. Эта величина составляет 2000—5000 на 1  $\text{мкм}^2$  узловой мембраны [7, 27]. Первоначальные экспе-



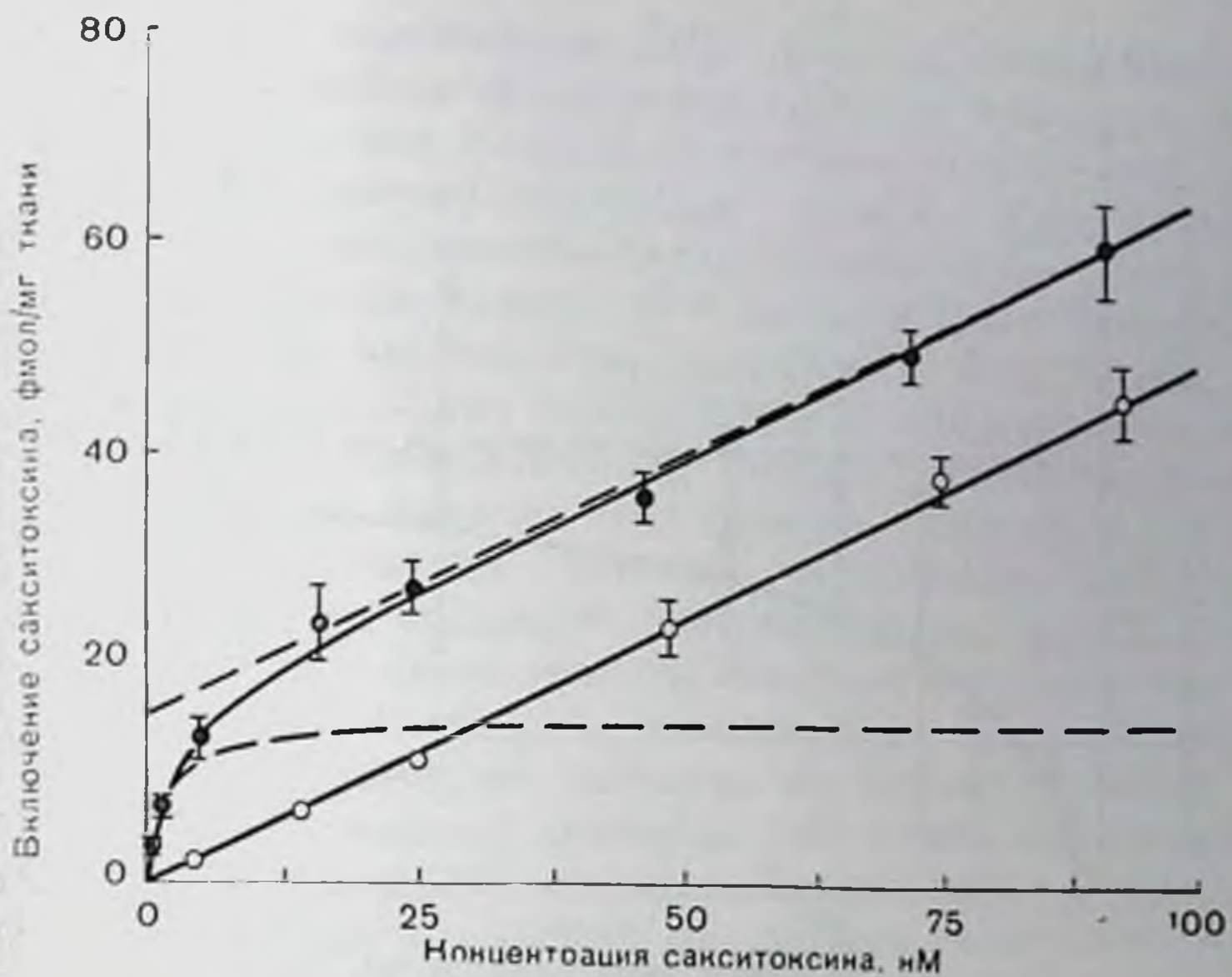


рис. 85. Включение меченого сакситоксина миелинизированными волокнами и седалищного нерва кролика.

Пунктирная прямая линия представляет собой асимптоту кривой связывания. Суммарная кривая связывания соответствует уравнению:

$$U = \text{Сакситоксин}_{\text{связанный}} = \frac{0,50 [\text{сакситоксин}] + 15,7 [\text{сакситоксин}]}{1,9 + [\text{сакситоксин}]}$$

Каждая точка построена по данным 2—10 измерений. Построенные методом наименьших квадратов кривые связывания соответствуют точкам, полученным при различных концентрациях меченого сакситоксина (черные кружки) и 10 мкМ немеченого тетродотоксина (светлые кружки). Пунктирная гиперболическая кривая соответствует насыщаемой компоненте.

Эксперименты по связыванию в узлах Ранвье лягушки были безуспешны, поскольку не позволяли выделить насыщаемую компоненту связывания, по-видимому, вследствие ее малой величины по сравнению с литейной компонентой. Однако кривые связывания, полученные в миелинизированных волокнах из седалищного нерва кролика, продемонстрировали наличие явной насыщаемой компоненты связывания в дополнение к линейной компоненте. Из значений максимальной насыщаемой связывающей способности (17 фмол на 1 мг ткани; см. табл. 21) и площади узлов седалищного нерва кролика (8 см<sup>2</sup>/г, [40]) было рассчитано [31], что плотность каналов в нерве кролика даже выше, чем предполагалось на основании электрофизиологических экспериментов с седалищным нервом лягушки, и составляет около 12 000 центров связывания или натриевых каналов на 1 мкм<sup>2</sup>. Это значение может быть немного преувеличено, поскольку анализ большего числа образцов, чем было сделано в [31], показал значение суммарного насыщаемого связывания 15,7 ± 1,7 фмол/мг (рис. 85). Поскольку около 2,8 фмол/мг может быть ассоциировано с немиелинизированными волокнами [31], площадь каналов в миелинизированных волокнах составляет как раз около 10 000 на 1 мкм<sup>2</sup>. Это значение

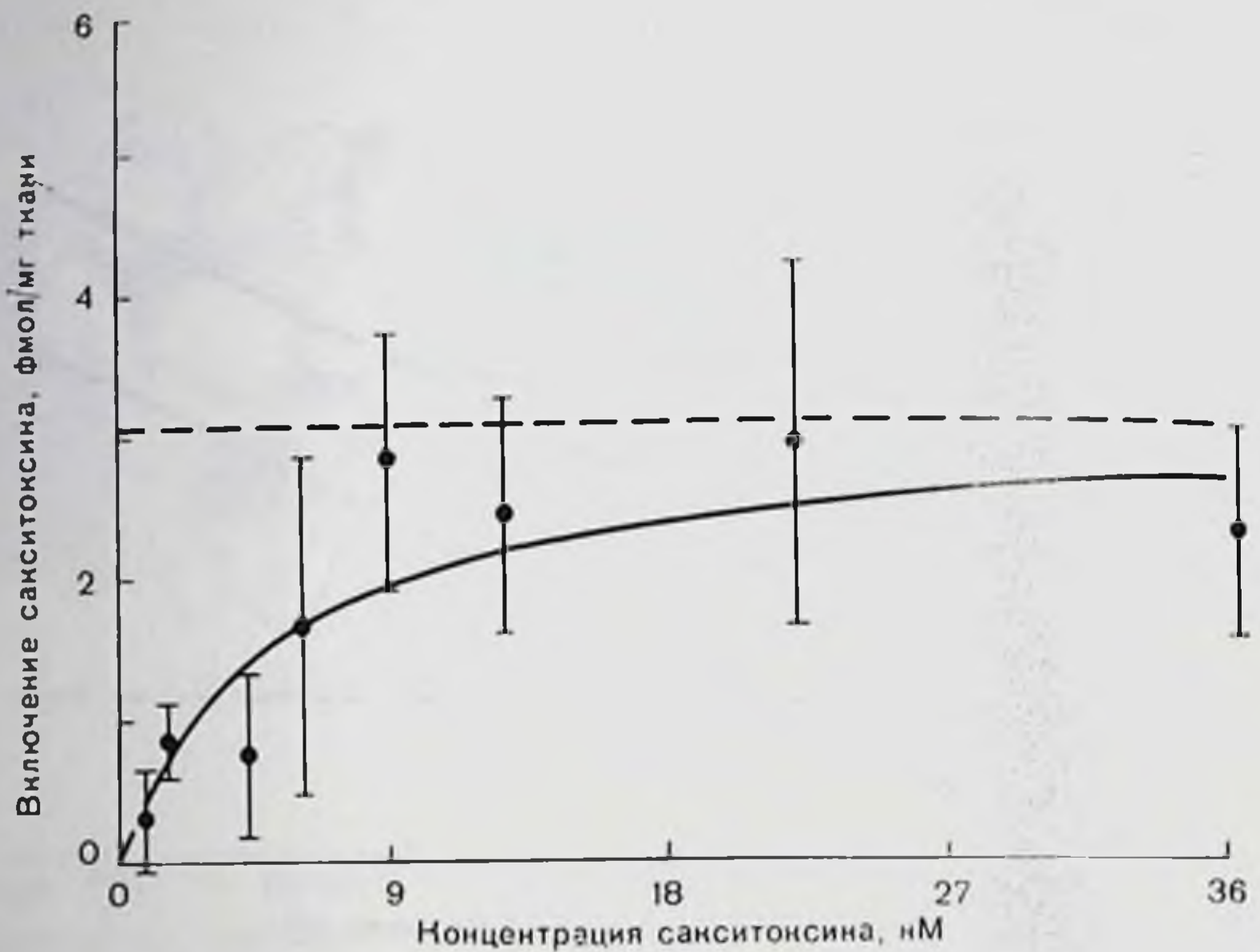


Рис. 86. Насыщаемая компонента включения меченого сакситоксина миелинизированными волокнами седалищного нерва лягушки. Сплошная линия соответствует уравнению:

$$U = \text{Сакситоксин}_{\text{связанный}} = \frac{3,1 [\text{сакситоксин}]}{5,3 + [\text{сакситоксин}]}$$

Каждая точка построена по данным 6—8 измерений. Вертикальные отрезки указывают ошибку для каждой точки.

указывает на плотную упаковку каналов в мембране. Levinson и Ellory [25] рассчитали, что по данным инактивации под действием рентгеновского облучения натриевый канал соответствует белку диаметром 8 нм, т. е. почти половина поверхности мембраны занята каналами! Если даже эти значения все еще слишком высоки (например, преувеличены в 2 раза), не вызывает сомнения факт, что плотность натриевых каналов в узловой мембране млекопитающих очень высока и что сейчас уже время определить значение  $\bar{g}_{\text{Na}}$  для волокон млекопитающих.

Описанные электрофизиологические эксперименты на миелинизированных волокнах лягушки показали, что плотность каналов в нодалных мембранах амфибий, хотя и превосходит таковую для мышц, тем не менее значительно ниже плотности каналов в нодалных мембранах млекопитающих, установленной по данным экспериментов по химическому связыванию. Это соображение кажется достаточно важным, чтобы быть проверенным экспериментально более детально путем дальнейшего изучения связывания с узлами Ранвье лягушки и прямого сравнения полученных результатов с соответствующим связыванием с узлами млекопитающих. В ранних экспериментах на лягушках (подобных описанным на рис. 85) перекрывание зоны ошибок для темных и светлых точек было так велико, что полностью маскировало на-

личие насыщаемой компоненты [31]. Степень неопределенности результатов в настоящее время резко снижена благодаря определению захвата меченого токсина интактным седалищным нервом лягушки и последующему вычитанию из него соответствующего захвата в присутствии высоких концентраций немеченого тетродотоксина аналогичным нервом того же животного. В результате удается установить насыщаемую компоненту. Результаты, полученные при изучении 52 пар нервов лягушек, приведены на рис. 86. Из него видно, что хотя заметный разброс экспериментальных точек и сохраняется, наличие насыщаемой компоненты связывания меченого сакситоксина сомнений не вызывает. Полученное методом наименьших квадратов гиперболическое приближение к экспериментальным точкам при максимальном соответствии дает значение емкости насыщаемого связывания  $3,1 \pm 0,88$  фмол на 1 мг ткани. Если подалная площадь на единицу массы нерва лягушки близка к таковому значению для нерва млекопитающих и если пренебречь вкладом немиелинизированных волокон, то плотность связывающих центров на узловоей мембране амфибий составит более 2000 на  $1 \text{ мкм}^2$ , что хорошо согласуется с результатами, полученными в экспериментах с мембранным шумом [7, 36].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Almers N., Levinson S. R.* Tetrodotoxin binding to normal and depolarized frog muscle and the conductance of a single sodium channel. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 247, 483—509.
2. *Baer M., Best P. M., Reuter H.* Voltage-dependent action of tetrodotoxin in mammalian cardiac muscle. — *Nature*, 1976, 263, 344—345.
3. *Colquhoun D., Henderson R., Ritchie J. M.* The binding of labelled tetrodotoxin to non-myelinated nerve fibres. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1972, 227, 95—126.
4. *Colquhoun D., Rang H. P., Ritchie J. M.* The binding of tetrodotoxin and  $\alpha$ -bungarotoxin to normal and denervated mammalian muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1974, 240, 199—226.
5. *Colquhoun D., Ritchie J. M.* The interaction at equilibrium between tetrodotoxin and mammalian non-myelinated nerve fibres. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1971, 221, 533—553.
6. *Colquhoun D., Ritchie J. M.* The kinetics of the interaction between tetrodotoxin and mammalian non-myelinated nerve fibres. — *Mol. Pharmacol.*, 1972, 8, 285—292.
7. *Conti F., Hille B., Neumcke B., Nonner W., Stämpfli R.* Conductance of the sodium channel on myelinated nerve fibres with modified sodium inactivation. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1976, 262, 729—742.
8. *Cuatrecasas P., Hollenberg M. D.* Membrane receptors and hormone action. — *Adv. Protein Chem.*, 1976, 30, 251—451.
9. *Cuervo L. A., Adelman W. J.* Equilibrium and kinetic properties of the interaction between tetrodotoxin and the excitable membrane of the squid giant axon. — *J. Gen. Physiol.*, 1970, 55, 309—335.
10. *Dorfman L. M., Wilzbach K. E.* Tritium labelling of organic compounds by means of an electric discharge. — *J. Phys. Chem.*, 1959, 43, 799—801.
11. *Hafemann D. R.* Binding of radioactive tetrodotoxin to nerve membrane preparations. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, 266, 548—556.
12. *Henderson R., Ritchie J. M., Strichartz G.* The binding of labelled saxitoxin to the sodium channels in nerve membranes. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 235, 783—804.

13. *Henderson R., Ritchie J. M., Strichartz G.* Evidence that tetrodotoxin and saxitoxin act at a metal cation binding site in the sodium channels of nerve membrane. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 3936—3940.
14. *Hille B.* Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve. — *J. Gen. Physiol.*, 1968, 51, 199—219.
15. *Hille B.* Charges and potentials at the nerve surface: Divalent ions and pH. — *J. Gen. Physiol.*, 1968, 51, 221—236.
16. *Hille B.* The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. — *J. Gen. Physiol.*, 1971, 58, 599—619.
17. *Hille B.* The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve. — *J. Gen. Physiol.*, 1972, 59, 637—658.
18. *Hille B.* The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin: A structural hypothesis. — *Biophys. J.*, 1975, 15, 615—619.
19. *Hille B., Campbell D. T.* An improved vaseline gap voltage clamp for skeletal muscle fibers. — *J. Gen. Physiol.*, 1976, 67, 265—293.
20. *Hille B., Ritchie J. M., Strichartz G.* The effect of surface charge on the nerve membrane on the action of tetrodotoxin and saxitoxin in frog myelinated nerve. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 250, 34—45P.
21. *Ildefonse M., Roy G.* Kinetic properties of the sodium current in striated muscle fibres on the basis of the Hodgkin — Huxley theory. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1972, 227, 419—431.
22. *Jaimovich E., Venosa R. A., Shrager P., Horowicz P.* The density and distribution of tetrodotoxin receptors in normal and detubulated frog sartorius muscle. — *J. Gen. Physiol.*, 1976, 67, 399—416.
23. *Kao C. Y.* Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. — *Pharmacol. Rev.*, 1966, 18, 997—1039.
24. *Levinson S. R.* The purity of tritiated tetrodotoxin as determined by bioassay. — *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1975, 270, 337—348.
25. *Levinson S. L., Ellory J. C.* Molecular size of the tetrodotoxin binding site estimated by irradiation inactivation. — *Nature New Biol.*, 1973, 245, 122—123.
26. *Neumcke B.* Specific and non-specific surface charges at nerve membranes. — In: *Electrical Phenomena at the Biological Membrane Level*, 1977, p. 257—269. Elsevier, Amsterdam.
27. *Nonner W., Rojas E., Stämpfli R.* Gating currents in the node of Ranvier: Voltage and time dependence. — *Philos. Trans. R. Soc. B.*, 1975, 270, 483—492.
28. *Ogura Y.* Fugu (puffer-fish) poisoning and the pharmacology of crystalline tetrodotoxin poisoning. — In: *Neuropoisons: Their Pathophysiological Actions*, v. 1, *Poisons of Animal Origin*, ed. by L. L. Simpson, 1971, p. 139—156. Plenum Press, New York.
29. *Ritchie J. M., Rogart R. B.* The binding of labelled saxitoxin to the sodium channels in normal and denervated mammalian muscle, and in amphibian muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, 269, 341—354.
30. *Ritchie J. M., Rogart R. B.* Characterization of exchange-labelled saxitoxin and the origin of linear uptake by excitable tissue. — *Mol. Pharmacol.*, 1977, 13, 1136—1146.
31. *Ritchie J. M., Rogart R. B.* The density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and the nature of the axonal membrane under the myelin sheath. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 211—215.
32. *Ritchie J. M., Rogart R. B.* The binding of tetrodotoxin and saxitoxin to excitable tissue. — *Rev. Physiol. Pharmacol. Biochem.* (in press), 1977.
33. *Ritchie J. M., Rogart R. B., Strichartz G. S.* A new method for labeling saxitoxin and its binding to non-myelinated fibres of the rabbit vagus, lobster walking leg, and garfish olfactory nerves. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1976, 261, 477—494.
34. *Schantz E. J.* Paralytic shellfish poisoning and saxitoxin. — In: *Neuropoisons: Their Pathophysiological Actions*, v. 1, *Poisons of Animal Origin*, edited by L. L. Simpson, 1971, p. 159—168. Plenum Press, New York.
35. *Schauf C. L.* The interactions of calcium with myxicola giant axons and a description in terms of a simple surface charge model. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1975, 248, 613—624.

36. *Sigworth F. J.* Sodium channels in nerve apparently have two conducting states. — *Nature*, 1977, 270, 265—267.
37. *Sola O. M., Martin W.* Denervation hypertrophy and atrophy of the hemidiaphragm of the rat. — *Am. J. Physiol.*, 1953, 172, 324—332.
38. *Tunino H., Nakata T., Kaacko T., Kishi Y.* A stereospecific total synthesis of d, l-saxitoxin. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 2818—2819.
39. *Woodhull A. M.* Ionic blockage of sodium channels in nerve. — *J. Gen. Physiol.*, 1973, 61, 687—708.
40. *Yates A. J., Bouchard J. P., Wherrett J. R.* Relation of axon membrane to myelin membrane in sciatic nerve development: Comparison of morphological and chemical parameters. — *Brain Res.*, 1976, 104, 261—271.

## ОПОСРЕДОВАННЫЙ НОСИТЕЛЕМ ТРАНСПОРТ И «ТЕКУЧЕСТЬ» МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

В. ВИЛБРАНДТ  
(W. WILBRANDT)

*Фармакологический институт, 3000 Бери, Швейцария*

В настоящее время широко распространено представление, что клеточные мембраны состоят из жидкого липидного бислоя и встроенных в него белков, которые могут или не могут пронизывать насквозь мембрану. Rosenberg, Vestergaard-Bogind, Wilbrandt [14], Csaky и Ho [5] предположили, что транспортный комплекс опосредованных транспортных систем липидорастворим и поэтому может проходить через мембрану (в отличие от обычных гидрофильных переносимых субстратов). По другим представлениям, которые преобладают в настоящее время, субстрат связывается с белком так, что возможные виды транслокации включают конформационные изменения белковых молекул. Последняя гипотеза соответствует наблюдаемой иногда высокой химической специфичности опосредованных транспортных систем. Это подтверждается также свойствами ряда выделенных белков, которые очень близки к ожидаемым, исходя из данных о транспорте.

Если транспортный комплекс проходит через липидную фазу, скорость движения должна зависеть от «текучести» мембраны, которая, как известно, меняется в зависимости от липидного состава и в значительной степени зависит от содержания холестерина в мембране. В связи с этим мы начали наши исследования на системах опосредованного транспорта в эритроцитах человека с нормальным, повышенным и пониженным содержанием холестерина. До сих пор мы публиковали данные о переносе глюкозы и холина, открытые Askari [1] и подробно изученные Martin [9—11]. Кроме того, здесь представлены данные литературы, которые будут использованы для обсуждения.

Для сравнения мы изучали транспорт, который по общему мнению связан с липидрастворимыми носителями: перенос калия, вызываемый валиномицином или нонактином, через мембрану эритроцитов, также в клетках с различным содержанием холестерина.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на эритроцитах человека, полученных от общества «Красный Крест», обычно однодневных. Кровь перед употреблением промывали несколько раз соевым буферным раствором (в холодильнике кровь хранится не более 4 сут).

Перенос глюкозы измеряли по хорошо известному методу Sen и Widdas [15]. Для контроля за изменением объема клеток, предварительно нагруженных глюкозой, во время выхода ее был использован метод светорассеяния.

Перенос холина определяли по выходу  $^{14}\text{C}$ -холина из клеток, предварительно нагруженных 0,036 мМ холина, используя миллипоровские фильтры (диаметр пор 3 м). Меченый холин получен из фирмы «Amersham». Результаты экспериментов были выражены графически в полулогарифмических координатах как зависимость количества холина, остающегося в клетках, от времени [9—11].

Вязкость мембранного липида (микровязкость) измеряли по поляризации флюоресценции по методу Shinitzky и Inbar [16]. Было обнаружено, что «микровязкость» линейно зависит от содержания холестерина ( $\eta$  возрастает примерно в 3 раза при увеличении содержания холестерина на 1 мг в 1 мл клеток).

Содержание холестерина меняли по методу Cooper, Arner, Wiley и Shattie с небольшими модификациями [4], обрабатывая клетки либо лецитиновыми липосомами без холестерина (для удаления холестерина из клеток), либо липосомами из лецитина и холестерина (1+2) (для введения холестерина в клеточные мембраны). Содержание холестерина в клетках, обработанных таким образом, составляет от 0,4 до 3,0 мг на 1 мл клеток. Холестерин определяли по методу Chiamori и Henry [3]. Холестерин полусукцинат был любезно предоставлен M. Shinitzky.

Валиномицин- и ноакинвызываемый перенос ионов калия определяли по сокращению клеток при потере хлорида калия, используя тот же метод светорассеяния, что и в экспериментах с глюкозой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты опытов с ноакином приведены на рис. 87 и 88. Скорость выхода калия из клеток зависит от содержания холестерина и, наоборот, уровень его зависит от скорости потери клетками ионов калия (см. рис. 80). Для того чтобы проверить, действительно ли эта зависимость определяется «текучестью», была исследована температурная зависимость. Из рис. 88 ясно, что кажущаяся энергия активации реакции потери калия растет почти линейно с ростом содержания холестерина. Аналогичные результаты были получены ранее в опытах с валиномицином [17]. Таким образом, эти модельные системы, как и предполагалось, зависят по-видимому, от текучести мембраны.

В опытах на системе с глюкозой получены различные результаты. На рис. 89 приведены опыты, в которых содержание холестерина изменяется в пределах 0,4—1,8 мг на 1 мл клеток. Эквивалентные значения  $V_{\text{макс}}$  растут с уменьшением содержания холестерина и соответственно с уменьшением «микровязкости». Последние опыты с более высоким содержанием холестерина (3 мг/мл) со всей очевидностью показали, что и в этих пределах

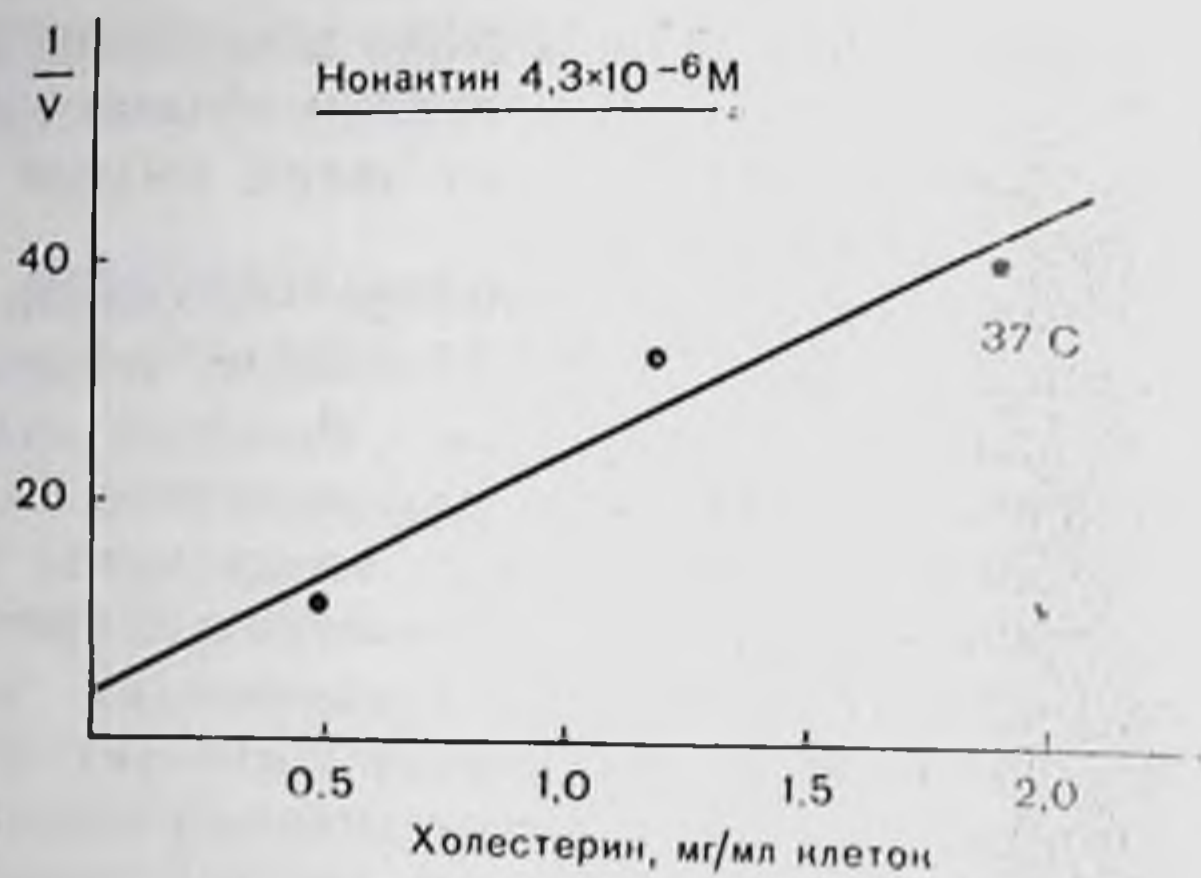


Рис. 87. Вызываемое нонактином выделение калия из эритроцитов человека как функция содержания холестерина в мембране. Ордината — обратная скорость транспорта (усл. ед.), абсцисса — содержание холестерина в клетках.

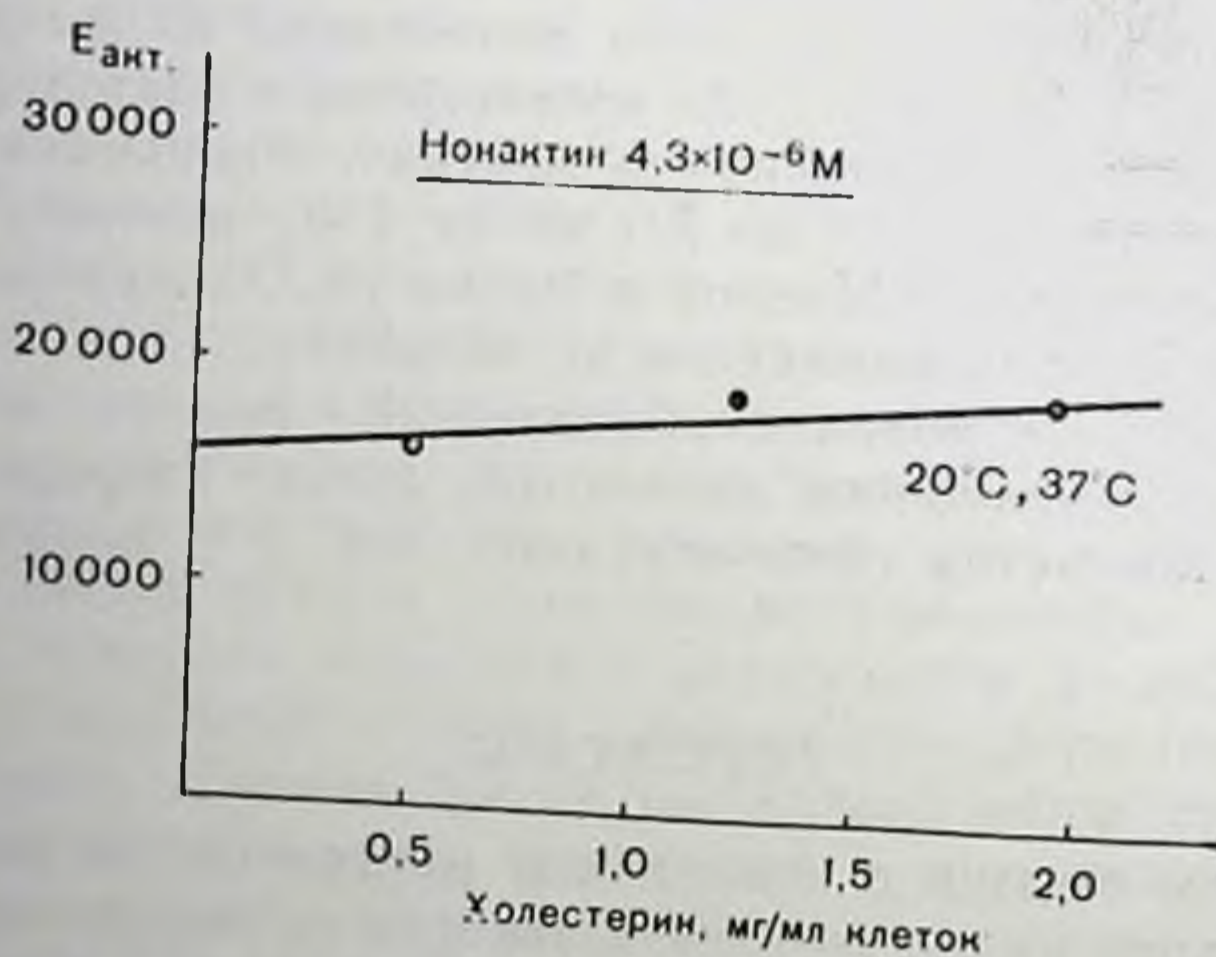


Рис. 88. Кажущаяся энергия активации (в ккал/мол) вызываемого нонактином выделение калия из эритроцитов как функция содержания холестерина в клетках.

продолжается уменьшение скорости эквивалентного транспорта с ростом содержания холестерина, хотя и в меньшей степени.

Таким образом, в этих экспериментах скорость транспорта также зависит от содержания холестерина в мембране, но в обратном направлении по сравнению с зависимостью, показанной для транспорта калия, опосредованного ионофором. «Текучность» мембраны, очевидно, либо совсем не влияет на транспорт калия, либо ее влияние перекрывается другими изменениями в системе, которые вызывает холестерин.

В последних экспериментах по транспорту холина получены аналогичные результаты. Выход меченого холина из предвари-



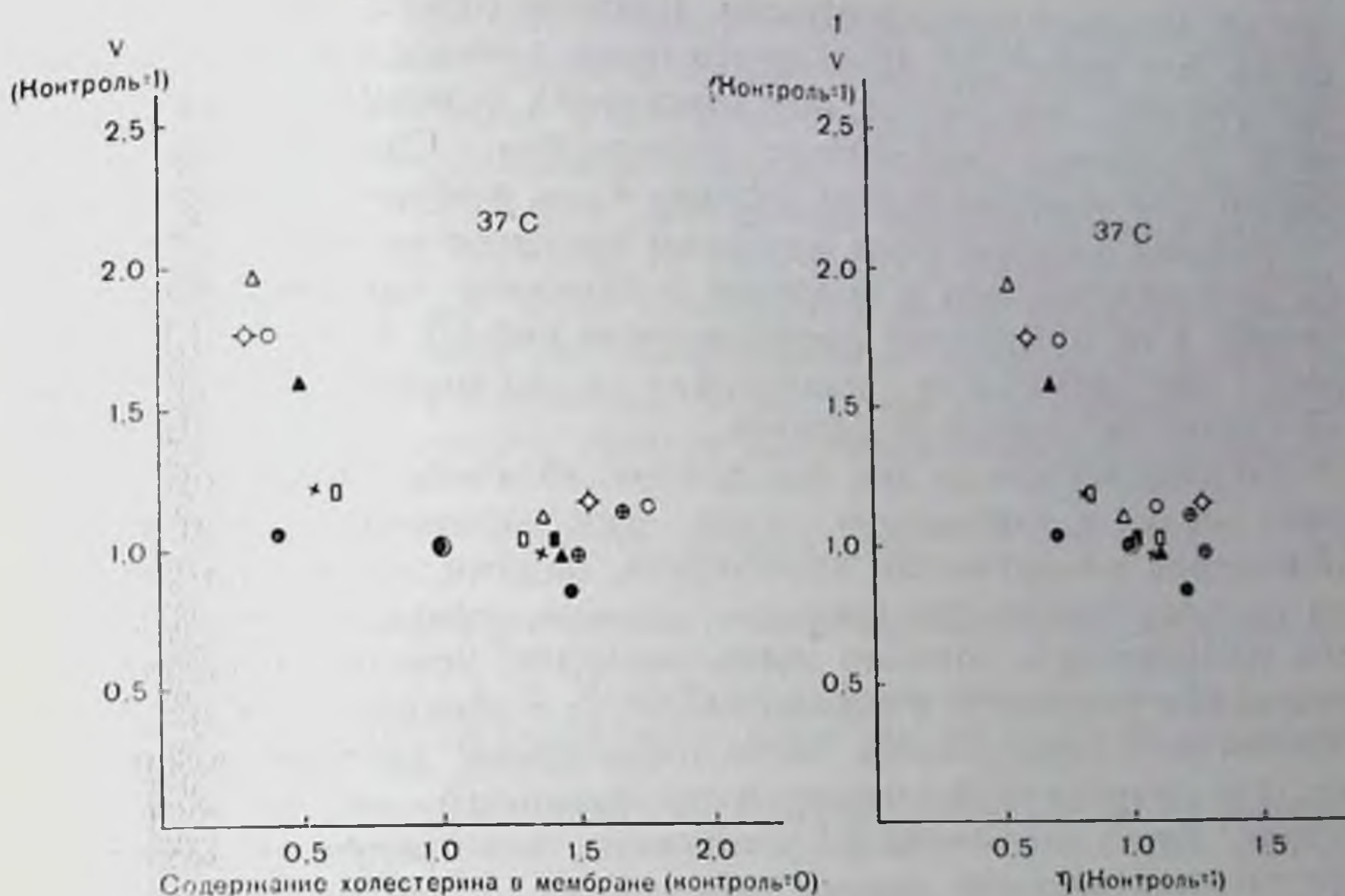


рис. 89. Обратная максимальная скорость ( $V$ ) транспорта глюкозы (ордината) как функция содержания холестерина (мг/мл клеток) в клетках (А) и микровязкости (Б).

тельно нагруженных клеток возрастал при увеличении содержания холестерина с 1,2 до 3 мг на 1 мл клеток. Наклон графика Martin (логарифм доли холна, остающегося в клетке, относительно времени) возрастает в 2 раза.

Таким образом, реакция двух изученных опосредованных транспортных систем на изменение содержания холестерина в мембране, по-видимому, не совпадает с предположением, что транспортный комплекс движется через липид.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Описанные результаты экспериментов в целом не согласуются с предположением о «липидном» пути опосредованного транспорта. Их, однако, стоит сравнить с данными, полученными в других работах. Masiak и Le Fevre [12] обнаружили, что удаление холестерина из мембраны (после предварительной стимуляции) ингибирует транспорт глюкозы. При замене холестерина стероидами получены данные, из которых достоверно следует, что гидроксильная группа у  $C_3$  имеет большое значение. Read и McElhaneу [13] также изучали влияние возрастания содержания холестерина или 3-кетостероида (который увеличивает текучесть мембраны в мембране. Они обнаружили небольшое уменьшение  $V_{\text{макс}}$  для глюкозы в клетках с дефицитом холестерина. Этими авторами также был изучен транспорт уридина, который, по данным Cass и Pater-

son [2] является опосредованным. Влияние содержания холестерина на этот транспорт проявляется более сложным путем. Выведение уридина замедляется при увеличении содержания холестерина и ускоряется при замене холестерина. Однако вычисление параметров транспорта дает падение  $V_{\text{макс}}$  в обоих экспериментах.

Перенос анионов через мембраны эритроцитов в последнее время интерпретируется в основном в терминах опосредующего носителя, а не в терминах проницаемости пор [7]. Doulicke [6] сообщил, что недостаток холестерина в мембранах эритроцитов не влияет на перенос сульфатов.

Обсуждавшиеся до сих пор данные, казалось бы, не подтверждают мысль о «липидном» пути опосредованного транспорта. Изменения в содержании холестерина, видимо, обычно не влияют на системы транспорта глюкозы, холина, уридина и сульфата в том направлении, которого можно ожидать, исходя из данных об изменении текучести, и влияют частично в обратном направлении. Однако есть определенное число наблюдений, которые показывают, что однозначный ответ на поставленный вопрос дать еще нельзя. Kroes и Ostwald [8] установили, что транспорт натрия в эритроцитах морской свинки замедляется с ростом содержания холестерина. Wiley и Cooper [18] обнаружили, что в богатых холестерином клетках (двукратное содержание холестерина) ингибируется как убаин- и фуросемидчувствительный приток калия, так и приток натрия.

Таким образом, имеются случаи опосредованного транспорта, на которые изменения содержания холестерина влияют так, как и можно было ожидать, исходя из данных о текучести. Ситуация сложилась довольно сложная. Тот факт, что в первой группе наблюдаемые изменения в содержании холестерина не давали одинаковых реакций, а действовали в противоположных направлениях, видимо, указывает на двойное действие холестерина.

В экспериментах с введением полусукцината холестерина (который спонтанно встраивается в мембрану без участия липосом) мы наблюдали снижение скорости транспорта глюкозы, как и можно было ожидать, исходя из роста вязкости. Однако кажущаяся энергия активации не изменяется. Возможно при дальнейших исследованиях полезнее использовать критерий кажущейся энергии активации, а не изменения скорости транспорта, который облегчит окончательное выяснение этого сложного вопроса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрен вопрос о том, имеет ли место транслокация в системе опосредованного транспорта через липидную фазу клеточной мембраны. Содержание холестерина в мембране эритроцитов (который, как известно, влияет на текучесть мембранного липида) изменяли по методу Cooper и др. Изменения содержания холестерина вызывают такие нарушения валиномицин- и нонакинобусловленного выхода калия из эритроцитов, которые и можно

было ожидать, принимая гипотезу о движущемся через мембранный липид носителе: скорость выхода уменьшается при высоком содержании холестерина и наоборот. Однако в тех же системах транспорт глюкозы и холина, который, как известно, опосредован носителем, замедляется при уменьшении содержания холестерина и наоборот. Таким образом, по-видимому, в последних случаях транслокация идет не через мембранный липид. Опубликованные данные о других системах опосредованного транспорта содержат примеры обоих типов реакции на изменение содержания холестерина. Выяснение вопроса требует дополнительных экспериментов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Askari A.* Uptake of some quaternary ammonium ions by human erythrocytes. — *J. Gen. Physiol.*, 1966, 49, 1147—1160.
2. *Cass C. E., Paterson A. R. P.* Mediated transport of nucleosides by human erythrocytes specificity toward purine nucleosides as permeants. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 291, 734—746.
3. *Chiamori M., Henry R. J.* Study of the ferric chloride method for determination of total cholesterol and cholesterol esters. — *Am. J. Clin. Pathol.*, 1959, 31, 305—309.
4. *Cooper R. A., Arner C. E., Wiley J. S., Shattil S. J.* Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. — *J. Clin. Invest.*, 1975, 55, 115—126.
5. *Csaky T. Z., Ho P. M.* Effect of dimethylsulfoxide on the intestinal sugar transport. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, 122, 860—865.
6. *Deuticke B.* Properties and structural basis of simple diffusion pathways in the erythrocyte membrane. — *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1977, 78, 1—97.
7. *Gunn R. B.* A titratable carrier for monovalent and divalent inorganic anions in red blood cells. — In: *Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes/Recent Advances in Membrane and Metabolic Research*, edited by E. Gerlach, K. Moser, E. Deutsch, W. Wilmanns, 1972, p. 77—79. Georg Thieme, Stuttgart.
8. *Kroes J., Ostwald R.* Erythrocyte membranes — effect of increased cholesterol content on permeability. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 249, 647—650.
9. *Martin K.* Concentrative accumulation of choline by human erythrocytes. — *J. Gen. Physiol.*, 1968, 51, 497—616.
10. *Martin K.* Some properties of an SH group essential for choline transport in human erythrocytes. — *J. Physiol.*, 1971, 213, 647—664.
11. *Martin K.* Extracellular cations and the movement of choline across the erythrocyte membrane. — *J. Physiol.*, 1972, 224, 207—230.
12. *Masiak St. J., Le Fevre P. G.* Effects of membrane steroid modification on human erythrocyte glucose transport. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, 162, 442—447.
13. *Read B. D., McElhaney R. N.* Influence of membrane lipid fluidity of glucose and uridine facilitated diffusion in human erythrocytes. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 419, 331—341.
14. *Rosenberg Th., Vestergaard-Bogind B., Wilbrandt W.* Modellversuche zur Trägerhypothese von Zuckertransporten. — *Helv. Physiol. Acta*, 1956, 14, 334—341.
15. *Sen A. K., Widdas W. F.* Variations of the parameters of glucose transfer across the human erythrocyte membrane in the presence of inhibitors of transfer. — *J. Physiol.*, 1962, 160, 404—416.
16. *Shintzky M., Inbar M.* Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. — *J. Mol. Biol.*, 1974, 85, 603—615.

17. *Wilbrandt W.* The asymmetry of sugar transport in the cell membrane. — In: *Biochemistry of Membrane Transport*, FEBS — Symposium No. 42, edited by G. Semenza, E. Carafoli, 1977. Springer — Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.
18. *Wiley J. S., Cooper R. A.* Effect of membrane cholesterol on the cotransport system for  $\text{Na}^+$  plus  $\text{K}^+$  in the human erythrocyte. — *Fed. Proc.*, 1975, 34 (103), 237.

### ВРАЩАТЕЛЬНАЯ ДИФФУЗИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Р. ДЖ. ЧЕРРИ, У. МЮЛЛЕР, ДЖ. ШНЕЙДЕР  
(R. J. CHERRY, U. MÜLLER, G. SCHNEIDER)

*Кооперативная высшая техническая школа, Лаборатория биохимии,  
ETH-Центр, CH-8092 Цюрих, Швейцария*

Используя методы импульсного фотолиза, мы разработали методику для измерения времени вращательной релаксации в микро-секундных — миллисекундных временных интервалах. Целью разработки таких методов является исследование вращения белков в мембранах. Из данных о вязкости мембран можно выяснить, что глобулярные «собственные» белки [32] будут иметь время вращательной релаксации по меньшей мере порядка микросекунд [41]. Родопсин — единственный из мембранных белков, для которого вращательная диффузия охарактеризована количественно, имеет время релаксации при 20° С 20 мкс [41].

Определение вращательной диффузии мембранных белков позволит проверить, до какой степени белки способны к свободной диффузии, принятой в современной, широко распространенной модели мембраны [32]. Там, где свободная диффузия ограничена, измерения диффузии могут обеспечить полезную методику исследования взаимодействий, которые ответственны за рестрикцию. Наконец, вполне вероятно, что можно связать подвижность (или неподвижность) белков с функциональными свойствами мембраны.

### ИЗМЕРЕНИЕ МЕДЛЕННОЙ ВРАЩАТЕЛЬНОЙ ДИФФУЗИИ С ПОМОЩЬЮ ИМПУЛЬСНОГО ФОТОЛИЗА

Обычно триpletные состояния органических молекул живут в течение времени порядка миллисекунд при комнатной температуре. Это достаточно продолжительное время жизни можно использовать для измерения вращательного движения, которое слишком медленно для измерения обычными методами поляризационной флуоресценции.

Tripletные состояния, как правило, детектируются при наблюдении быстрых переходных абсорбционных изменений образца после возбуждения его импульсом света. Таким образом, можно наблюдать абсорбционные изменения, возникающие в результате либо триplet-триpletной абсорбции либо перехода в основное состояние. В том случае, когда возбуждающий свет плоскополяризован, возбуждаются только те молекулы, чей момент перехода

абсорбции находится либо в плоскости поляризации либо вблизи нее. Следовательно, частично ориентированные популяции возбужденных молекул уже выделяются из первоначально случайного распределения фотоселекцией. В результате кратковременные абсорбционные изменения в общем дихроичны. Дихроизм исчезает, как только возбужденные молекулы снова становятся неупорядоченными в результате броуновского движения; скорость этого процесса дает возможность вычислить скорость вращения. Из-за продолжительного времени жизни триплетного состояния таким образом может быть измерено время релаксации порядка миллисекунд. Аналогичные измерения в принципе можно провести с использованием других долгоживущих фотопродуктов, например свободных радикалов или стереоизомеров.

Аппаратура для измерения быстрых абсорбционных изменений уже описана [9]. Образцы возбуждаются импульсом плоскополяризованного света длительностью 1—2 мкс и длиной волны 540 нм из лазера на органическом красителе. Абсорбционные изменения для света, поляризованного параллельно ( $A_{\parallel}(t)$ ) и перпендикулярно ( $A_{\perp}(t)$ ) к возбуждающей вспышке, измеряются одновременно. Данные анализируются, рассчитывая параметр анизотропии, который определяется по уравнению:

$$r(t) = \frac{A_{\parallel}(t) - A_{\perp}(t)}{A_{\parallel}(t) + 2A_{\perp}(t)}, \quad (1)$$

где  $t$  — время после вспышки. Для сферических молекул  $r(t)$  разлагается экспоненциально как функция времени в виде выражения:

$$r(t) = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\Phi}\right), \quad (2)$$

где  $\Phi$  — время вращательной корреляции;  $r_0$  — значение  $r$  при  $t=0$ . Для сферы радиуса  $a$  в среде с вязкостью  $\eta$ :

$$\Phi = \frac{4\pi a^3 \eta}{3kT}, \quad (3)$$

где  $k$  коэффициент вращательной диффузии [14, 22].

Для нерегулярного объекта ситуация усложняется. В общем случае правая часть уравнения заменяется суммой пяти экспонент [10, 13]. Для объекта, имеющего ось симметрии (такого, как эллипсоид вращения), вводятся три экспоненты.

### ВРАЩАТЕЛЬНАЯ ДИФFUЗИЯ ЭОЗИН-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В ВЯЗКИХ РАСТВОРАХ

Для того чтобы измерить вращательную диффузию описанными выше методами, безусловно необходимо иметь хромофор с соответствующими спектральными свойствами. Ранее было показано, что эозин может играть роль маркера [29]; в настоящее время

мы получили его реакционноспособное изотиоцианатное производное, которое дает возможность ковалентно связывать эозин с белками [6]. Мы показали пригодность этого метода для измерения вращательной диффузии эозин-белковых конъюгатов в вязких смесях глицерин — вода [9].

Таблица 22. Определение размера частиц из данных вращательной диффузии\*

	Молекулярная масса, дальтоны	Теоретический радиус,** нм	Радиус по данным вращательной диффузии, нм
β-Лактоглобулин А (мономер)	18400	1,76	2,24
Овальбумин	43500	2,35	3,4
Сахарозоизомальтоза	221000	4,0	5,2
Qβ-вирус	$4,2 \cdot 10^6$	11,8***	14,3

\* Измерения вращательной диффузии проводили в 94% глицерине. Значение радиуса для Qβ-вируса представляет собой среднее из значений, полученных при измерении в 40% и 50% глицерине, 40% и 50% сахарозе.

\*\* Теоретические радиусы белков вычислены на основе их молекулярной массы в допущении, что белки представляют собой сферические и негидратированные молекулы.

\*\*\* Радиус определяли методом электронной микроскопии с негативным окрашиванием.

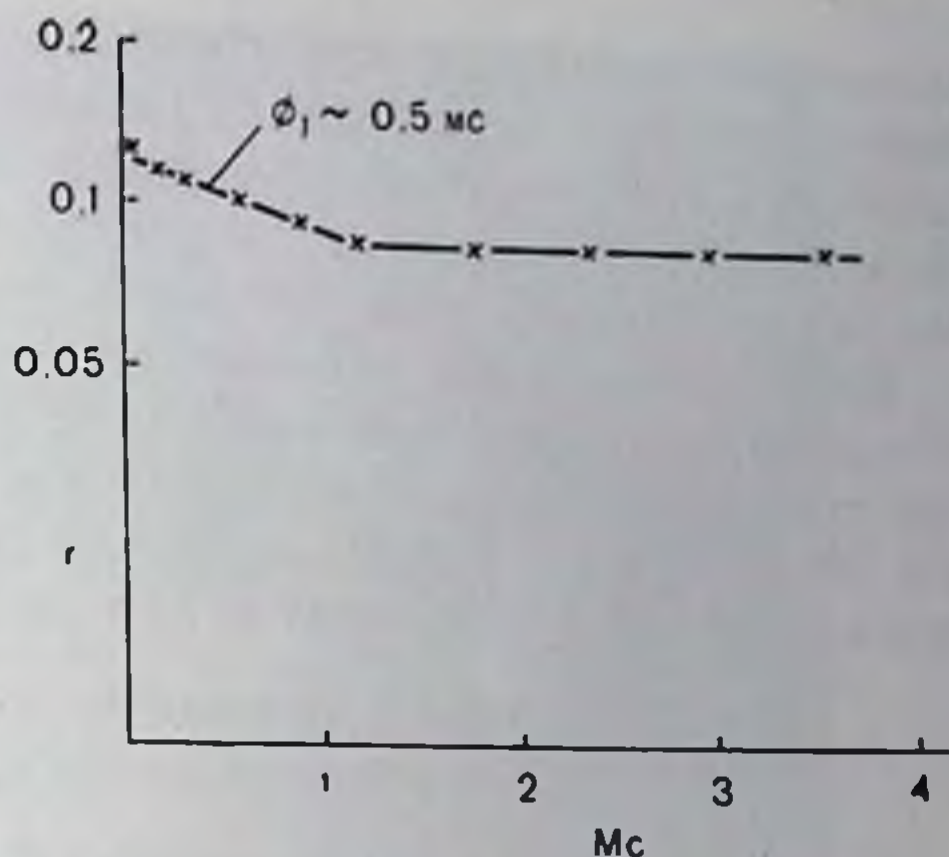
В табл. 22 приведены результаты экспериментов, проведенных с белками различных размеров. Из данных измерения коэффициента вращательной диффузии и вязкости раствора, с использованием уравнения 3, был рассчитан радиус молекулы белка. Как видно из табл. 22, экспериментальные значения совпадают со значениями, полученными из расчетов, предполагавших сферическую форму молекул белка. Различия между экспериментальными и теоретическими значениями можно, по-видимому, отнести за счет как отклонения формы молекулы от сферической, так и эффекта гидратации. Мы можем также показать, что измеренные скорости вращения меняются в зависимости от вязкости раствора, так, как мы предсказывали. Эти эксперименты ясно показывают, что наш метод надежно измеряет вращательное движение в интервале времен микро-миллисекунд.

### ВРАЩЕНИЕ БЕЛКОВ В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Первым практическим применением нашего метода было измерение вращения мембранных белков эритроцитов человека. Эта система была выбрана по той причине, что состав и свойства мембранных белков довольно хорошо охарактеризованы. Главной составной частью является спектрин — фибриллярный белок, состоящий из двух полипептидов с молекулярной массой 220 000 и 240 000 дальтон и полосы 3 (известной также как компонент а). Полоса 3 состоит из гидрофобных белков, имеющих молекуляр-

рис. 90. Временная зависимость анизотропии ( $r$ ) для меченных эозином мембран эритроцитов, вычисленной на основе сигналов основного состояния при 520 нм.

«Тени» суспендировали в 20 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, температура 22 °С. Перед измерением через образцы в течение 10 мин пропускали аргон для удаления кислорода.



ную массу около 90 000 дальтон, которые пронизывают мембрану, и содержит около 24% общего количества мембранных белков [33]. Они выполняют функции переноса анионов и других веществ [2, 3, 21, 23, 26]. Интенсивно изучается главный сialogликопротеин, гликофорин, который также пронизывает мембрану [34]. Похоже, что гликофорин вместе с полосой 3 составляет мембранные частицы, которые обнаруживаются при электронной микроскопии по методу замораживания-скалывания [17, 27].

Для того чтобы пометить эритроцитные мембраны изотопом эозина, метку инкубировали с intactными клетками. После инкубации непрореагировавшую метку удаляли промыванием и затем осмотическим лизисом получали тени эритроцитов. Мы показали, что в этом случае происходит селективное мечение полосы 3 эозином. Небольшое количество эозина (менее 10%) связывается со спектрином, но с гликофоринем, липидами и другими мембранными белками связываются ничтожные количества метки [5]. Следовательно, сигналы импульсного фотолиза, полученные с такими мечеными мембранами, возникают практически полностью от эозина, связанного с полосой 3.

Временные зависимости анизотропии, полученные из данных сигналов импульсного фотолиза от меченых эозином теней, показаны на рис. 90. Из рис. 90 видно, что эффект анизотропии разлагается по меньшей мере на два компонента. При больших периодах времени  $r(t)$  перестает зависеть от времени и кривая будет иметь форму:

$$r(t) = r_1 \exp\left(\frac{-t}{\phi_1}\right) + r_2.$$

Графическое определение  $\log[r(t) - r_2]$  от времени дает  $\phi \approx 0,5$  мс.

Исчерпывающее обсуждение этих результатов дано в [5]. Кратко наблюдаемая временная зависимость вероятнее всего связана с анизотропным движением полосы 3. Экспериментальные результаты объяснимы, если вращение ограничено осью, перпендикулярной плоскости мембраны. Временное постоянство связано с коэф-

коэффициентом диффузии для вращения вокруг этой оси. Независимый от времени компонент  $r_2$  отражает незначительную скорость вращения вокруг осей, расположенных в плоскости мембраны. Возможно, что существует некоторая агрегация в полосе 3, которая может вносить свой вклад в компонент  $r_2$ .

Единственным до настоящего времени количественным определением вращения мембранных белков является измерение, проведенное Cone с родопсином [11], которое дало время релаксации при 20° С 20 мкс. Вращение белков полосы 3 из мембран эритроцитов человека происходит с еще меньшей скоростью.

### ВРАЩАТЕЛЬНАЯ ДИФфуЗИЯ БАКТЕРИОРОДОПСИНА В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

Точная интерпретация измерений диффузии в нативных мембранах сложна по двум причинам. В первой стадии ситуация осложняется большим разнообразием присутствующих компонентов. Во-вторых, известное уравнение Стокса — Эйнштейна, которое связывает коэффициент диффузии с размером частиц и вязкостью раствора, неприменимо в двухмерных системах. И действительно нет уверенности, что диффузия в липидных бислоях может быть в любом случае описана с использованием терминов классической термодинамики. Модельные вычисления диффузии в мембранах уже есть в литературе [30], но результаты еще не проверены критически.

Для того чтобы иметь надежную базу для интерпретации измерений по диффузии в нативных мембранах, мы разработали модельную систему, на которой можно провести детальные количественные исследования диффузии белков. Система состояла из бактериородопсина — одного из наиболее хорошо охарактеризованных мембранных белков, включенного в синтетический липидный бислой. Бактериородопсин содержит свой хромофор, либо весь -транс, либо 13-цис ретиналь. При возбуждении бактериородопсина образуется ряд спектральных интермедиагов с периодами жизни порядка миллисекунд. Следовательно, кратковременные абсорбционные изменения, наблюдаемые сразу после возбуждения, могут быть использованы в описании стадий вращательного движения. Полное описание свойств бактериородопсина содержится в следующих обзорах [18, 24]. Включение бактериородопсина в липидные мембраны проводили следующим образом: пурпурные мембраны были выделены из *Halobacterium halobium* (штамм R<sub>1</sub>M<sub>1</sub>) по методу Oesterhelt и Stoekenius [25]. Мембраны переводили в раствор, суспендируя 1 мг в 4 мл 0,1 М ацетатного буфера с pH 5,0, содержащего 0,1% тритона X-100, в течение 24—30 ч в темноте при комнатной температуре. Реконструированные мембраны получали по методу Henderson [18]. После добавления нужного количества (1—5 мг) фосфатидилхолина либо димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) или дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) тритон удаляли длительным диализом против 0,1 М ацетатного буфера с pH 5,0, содержащего 0,2% нитрита натрия. Пос-



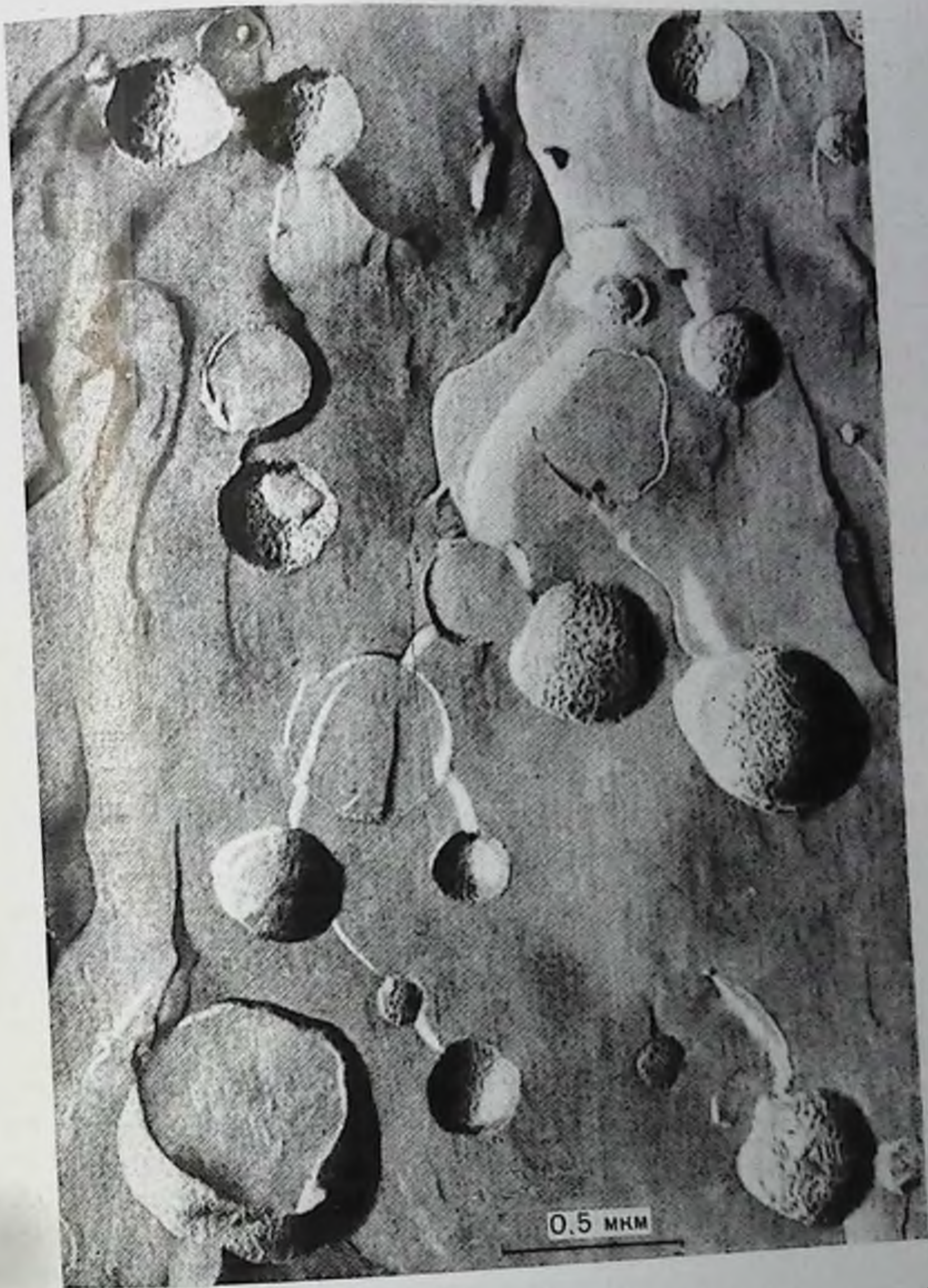


Рис. 91. Электронная микрофотография реконструированных частиц бактериородопсин-ДМФХ, охлажденных от температур выше фазового перехода липидов, выполненная по методу замораживания-скалывания.

Отношение белок/фосфолипид + 0,91. Образцы были нанесены на золотые диски и заморожены в жидком пропане при температуре  $-180-190^{\circ}\text{C}$  по методу M. Müller (неопубликовано). Замораживание-скалывание проводили в аппарате Balzer-300. Образцы реплицировали Pt-C, закрепляли SiO и изучали на электронном микроскопе Philips-200.

Для анализа образцы центрифугировали в сахарозном градиенте (4,5 — 40%) для удаления всех нереконструированных липидов и белков. Более подробно эта методика описана [8].

На рис. 91 приведена микрофотография реконструированных бактериородопсин-ДМФХ частиц, полученная по методу замора-

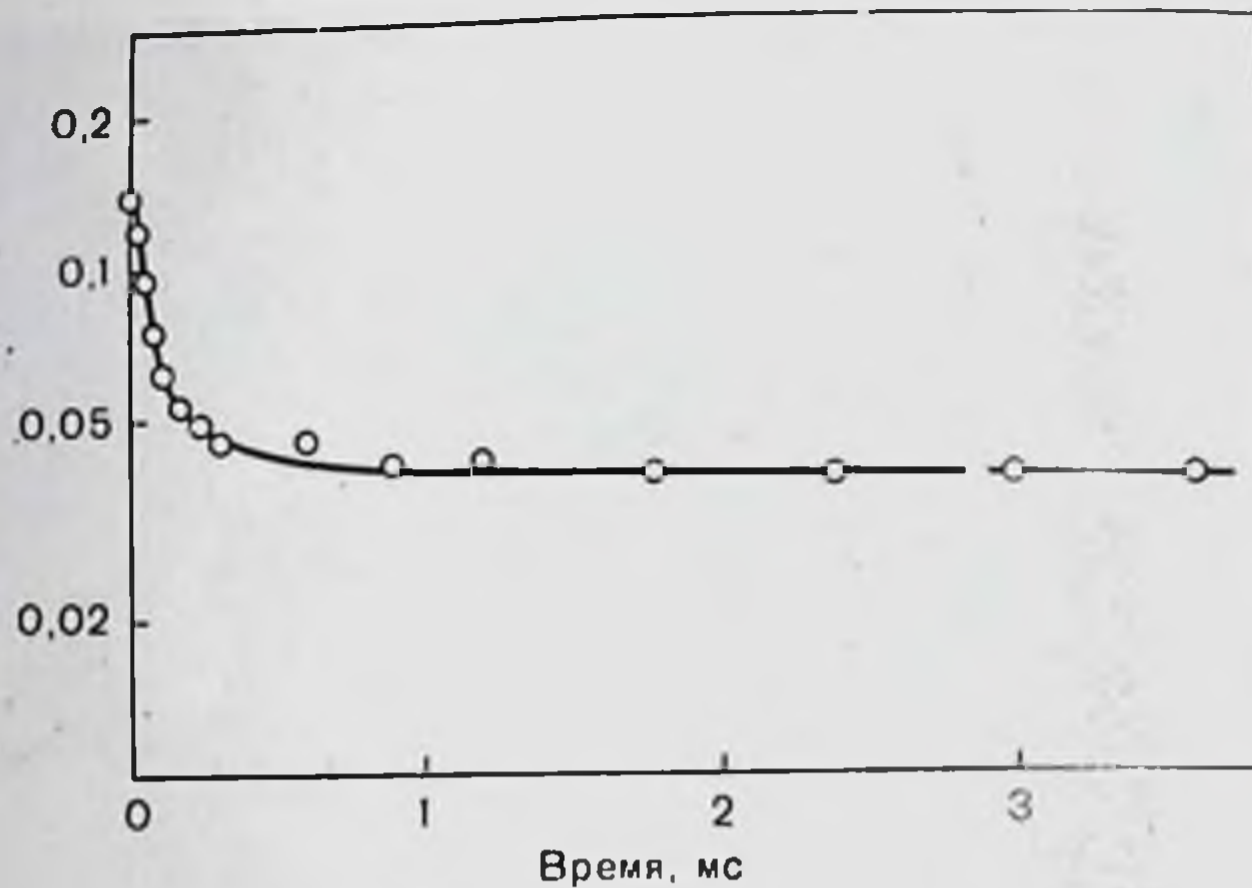


Рис. 92. Временная зависимость параметра анизотропии ( $r$ ), вычисленного на основе быстрых изменений в поглощении при 570 нм у частиц бактериородопсин-ДМФХ. Отношение белок/фосфолипид 1,23, температура  $+25^\circ\text{C}$ . Частицы суспендировали в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0.

живания-скалывания. Частицы, по-видимому, в основном, мономеллярные, диаметр 0,3—0,5 мкм. Здесь важен большой размер частиц, так как вращение их должно идти медленно, чтобы не усложнить измерения вращательной диффузии белков. Этот факт является существенным преимуществом нашей системы по сравнению с описанными ранее [28], где размер частиц был значительно меньше. Включение бактериородопсина показано его присутствием в мембранных частицах. Однако случайное распределение частиц сильно отличалось от регулярного гексагонального расположения, которое наблюдается в нативных пурпурных мембранах [1].

На рис. 92 показана типичная временная зависимость параметра анизотропии, вычисленная на основе данных о быстром изменении абсорбции. Видно, что  $r$  первоначально падает, но впоследствии достигает постоянного значения. ДМФХ и ДПФХ в случае измерения при температурах, превышающих соответствующие температуры перехода, дают кривые аналогичной формы. Однако скорость первоначального уменьшения меняется в зависимости от избытка липида, добавленного в смесь, и становится очень большой при уменьшении отношения белок : липид.

Начальное падение  $r$  означает наличие вращательного уменьшения. Так как образцы не содержат частиц, достаточно малых для того, чтобы они могли переворачиваться при скоростях, подразумевающихся при начальном уменьшении, мы пришли к выводу, что обнаружили вращение бактериородопсина в мембране. Этот вывод подтверждается при охлаждении образцов ниже температуры фазового перехода липидов; начальное падение  $r$  обратимо уничтожается при этих условиях [8].

Форма кривой очень похожа на полученную с меченым эозином эритроцитными мембранами тем, что после начального

падения идет область, независимая от температуры. Как и с эритроцитарными мембранами, мы интерпретируем наши результаты, как указывающие на вращательное движение, которое ограничено осью, перпендикулярной к плоскости мембраны. Коэффициент диффузии  $D_{||}$  для вращения вокруг оси можно вычислить из данных эксперимента, если известен угол  $\theta$  между моментом дипольного перехода бактериородопсина при 568 нм и перпендикулярном к плоскости мембраны. В других работах показано, что  $\theta$  можно определить как из данных о вращательной диффузии, так и независимо из данных о линейном дихроизме ориентированных пурпурных мембран [20]. Используя среднее значение  $\theta = 75^\circ$ , полученное этими методами, мы рассчитали значения  $D_{||}$ , приведенные в табл. 23. Ясно видна очень существенная зависимость  $D_{||}$  от соотношения белок:липид в реконструированной мембране.

Т а б л и ц а 23. Коэффициент вращательной диффузии ( $D_{||}$ ) бактериородопсина в реконструированных ДМФХ-везикулах при  $25^\circ\text{C}$  как функция отношения белок:липид. Аналогичная зависимость  $D_{||}$  от соотношения белок:липид наблюдается и для ДПФХ-везикул при  $45^\circ\text{C}$ .

Белок: фосфолипид (весовое отношение) в очищенных везикулах*	$D_{  }(\text{с}^{-1})$ **
0,25	$(11 \pm 4) \cdot 10^4$
0,37	$(6 \pm 2) \cdot 10^4$
0,60	$(3 \pm 1) \cdot 10^4$
0,91	$(5,7 \pm 1,3) \cdot 10^3$
1,69	$(2,3 \pm 0,5) \cdot 10^3$

\* Отношение белок:суммарный липид несколько ниже (максимальная разница 14%) в связи с тем, что пурпурные мембраны, кроме фосфолипидов, содержат сульфо- и гликолипиды.

\*\* Для более высоких значений  $D_{||}$  наблюдается небольшая дополнительная неточность из-за искажения сигнала при 568 нм при непродолжительном времени, связанного с перекрыванием положительных переходных состояний.

Зависимость  $D_{||}$  от концентрации белка может быть связана по меньшей мере, частично, с агрегацией белка. Агрегированное состояние бактериородопсина в этих образцах исследовали с помощью электронной микроскопии, дифракции рентгеновских лучей и измерения КД [8]. В итоге было показано, что бактериородопсин, видимо, существует в виде мономера при температурах выше температуры фазового перехода липида и при малых значениях отношения белок:липид. В образцах с более высоким отношением белок:липид не получено доказательств существования кристаллической решетки, но зафиксированы некоторые возмущения в спектре КД. Этот факт указывает на то, что имеется агрегация белка [19] и она может частично обуславливать более медленное

вращение, которое наблюдалось в образцах, содержащих наибольшее количество белка. Однако вряд ли этим можно объяснить изменения  $D_{||}$ , наблюдаемые в образцах с более низким отношением белок : липид, где не обнаружено возмущений в спектрах КД. Далее так как мы наблюдали изменения  $D_{||}$  примерно в 50 раз в изученных пределах состава образцов, для того чтобы объяснить полученные данные только на основе белковой агрегации, необходимо предположить, что агрегированное состояние также зависит от этого фактора. На основании электронной микрофотографии по методу замораживания-скалывания нельзя с уверенностью сказать, что подобные большие агрегаты действительно существуют. Поэтому для объяснения наших данных можно привлечь еще один очень важный фактор, а именно, что сама по себе мембранная вязкость зависит от концентрации белка. Такой эффект не особенно удивителен, так как водные растворы белков вызывают большие изменения в вязкости растворов в тех пределах концентраций, которые приложимы к нашим экспериментам [35]. Например, вязкость водного раствора сывороточного альбумина лошади возрастает примерно в 10 раз при увеличении концентрации белка с 0 до 235 г/л [15]. Более того, полуэмпирические уравнения для вязкости коллоидных растворов предсказывают порядок величины изменений вязкости, когда объемная фракция, занимаемая частицами, достигает 0,4 [16]. Детали молекулярных взаимодействий, которые приводят к подобным эффектам, до сих пор недостаточно охарактеризованы даже для простых систем. Edidin [12] в своем кратком обсуждении подчеркивает, что возможное влияние концентрации белка на мембранную вязкость, видимо, необходимо серьезно изучать. Предварительно можно считать, что вязкость клеточных мембран, в которых часто концентрация белка составляет 500 г/л и выше, может быть значительно больше, чем в липидных бислоях без белка.

Вращательная диффузия родопсина в дисковой мембране внешнего сегмента палочки глаза лягушки была измерена Cone [11], который получил значение  $D_{||} = 2 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$  при 20° С. По Saibil, Charbe и Worcester [31], белок занимает 1/3 объема гидрофобной области дисковой мембраны, так что соотношение белок : липид будет около 0,5. Сравнение с табл. 22 показывает, что данные о родопсине и настоящие измерения достаточно хорошо коррелируют, хотя и не стоит забывать про различный липидный состав двух систем. Бактериородопсин сам по себе закрепляется в нативной пурпурной мембране [29]. Однако вращение бактериородопсина, которое было измерено в реконструированных *Halobacterium halobium* мембранах, дало величину  $D_{||} = 2,3 \cdot 10^3$  при 22° С [7]. Сравнение этих результатов с последними данными невозможно без определения в этой мембране соотношения белок : липид.

Указанные эксперименты составляют первую стадию исследований на пути получения исчерпывающей информации о диффузии в той же простой системе. Могут быть рассмотрены измере-

ния вращательной и латеральной диффузии бактериородопсина, латеральной диффузии, мембранной вязкости, проведенные с помощью небольших молекул-зондов. Исследования подобного рода требуют определенной экспериментальной базы для критической проверки теоретических предсказаний.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blaurock A., Stoerkenius W.* Structure of the purple membrane. — *Nature New Biol.*, 1971, 233, 152—154.
2. *Brown P. A., Feinstein M. B., Sha'afi R. L.* Membrane proteins related to water transport in human erythrocytes. — *Nature*, 1975, 254, 523—525.
3. *Cabantchik Z. I., Rothstein A.* Membrane proteins related to anion permeability of human red cells. I. Localisation of disulfonic binding sites in proteins involved in permeation. — *J. Membr. Biol.*, 1974, 15, 207—226.
4. *Cherry R. J.* Protein and lipid mobility in biological and model membranes. — In: *Biological Membranes*, v. 3 ed. by D. Chapman, D. F. H. Wallich, 1976, p. 47—102. Academic Press, London — New York.
5. *Cherry R. J., Bürkli A., Busslinger M., Schneider G., Parish G.* Rotational diffusion of band 3 in the human erythrocyte membrane. — *Nature*, 1976, 263, 389—393.
6. *Cherry R. J., Cogoli A., Oppliger M., Schneider G., Semenza G.* A spectroscopic technique for measuring slow rotational diffusion of macromolecules. Part I: Preparation and properties of a triplet. — *Biochemistry*, 1976, 15, 3653—3656.
7. *Cherry R. J., Heyn M. P., Oesterhelt D.* Rotational diffusion and exciton coupling of bacteriorhodopsin in the cell membrane of *Halobacterium halobium*. — *FEBS Lett.*, 1977, 78, 25—30.
8. *Cherry R. J., Müller U., Henderson R., Heyn M. P.* Temperature dependent aggregation of bacteriorhodopsin in dimyristoyl and dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. — *J. Mol. Biol.* (in press), 1978.
9. *Cherry R. J., Schneider G.* A spectroscopic technique for measuring slow rotational diffusion of macromolecules. Part II: Determination of rotational correlation times of proteins in solution. — *Biochemistry*, 1976, 15, 3657—3661.
10. *Chuang T. J., Einsenthal K. B.* Theory of fluorescence depolarisation by anisotropic rotational diffusion. — *J. Chem. Phys.*, 1972, 57, 5094—5097.
11. *Cone R. A.* Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. — *Nature New Biol.*, 1972, 236, 39—43.
12. *Edidin M.* Rotational and translational diffusion in membranes. — *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1974, 3, 179—301.
13. *Ehrenberg M., Rigler R.* Polarised fluorescence and rotational Brownian motion. — *Chem. Phys. Lett.*, 1972, 14, 539—544.
14. *Einstein A.* On the theory of Brownian motion. — *Ann. Phys.*, 1905, 17, 549—562.
15. *Fahey K. R., Green A. A.* The viscosities of solutions of the proteins of horse serum. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 3039—4043.
16. *Ford T. F.* Viscosity-concentration and fluidity-concentration relationships for suspensions of spherical particles in Newtonian liquids. — *J. Phys. Chem.*, 1960, 64, 1168—1174.
17. *Gudotti G.* Membrane proteins. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1972, 41, 731—752.
18. *Henderson R.* The purple membrane from *Halobacterium halobium*. — *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1977, 6, 87—109.
19. *Heyn M. P., Bauer P. J., Dencher N. A.* A natural CD label to probe the structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium* by means of exciton coupling effects. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 67, 897—903.

20. Heyn M. P., Cherry R. J., Müller U. Transient and linear dichroism studies on bacteriorhodopsin: Determination of the orientation of the 568 nm all-trans retinal chromophore. — *J. Mol. Biol.*, 1977, 117, 607—620.
21. Ho M. K., Guidotti G. A membrane protein involved in anion exchange. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 675—683.
22. Jablonski A. Ueber die Abklingungsvorgänge polarisierter Photolumineszenz. — *Z. Physik*, 1961, 16a, 1—4.
23. Lin S., Spudich J. A. Biochemical studies on the mode of action of cytochalasin. — *B. J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 5778—5783.
24. Oesterhelt D. Isoprenoids and bacteriorhodopsin in Halobacteria. — *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 1976, 4, 133—166.
25. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. — *Meth. Enzymol.*, 1974, 31, 667—678.
26. Passow H., Fasold H., Zaki L., Schuhmann B., Lepke S. Membrane proteins and anion exchange in human erythrocytes. — In: *Biomembranes: Structure and Function*, ed. by G. Gardos, I. Szasz, 1975, p. 197—214 (FEBS Symposia series, v. 35, Proceedings of the 9th Meeting, Budapest, 1974). Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest.
27. Pinto da Silva P., Nicolson G. L. Freeze-etch localisation of concavalin A receptors to the membrane intercalculated particles of human erythrocyte ghost membranes. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 363, 311—319.
28. Racker E., Stoeckenius W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. — *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 662—663.
29. Razi Naqvi K., Gonzalez-Rodriguez J., Cherry R. J., Chapman D. A spectroscopic technique for studying protein rotation in membranes. — *Nature New Biol.*, 1973, 245, 249—251.
30. Saffman G., Delbrück M. Brownian motion in biological membranes. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 3111—3113.
31. Saibil H., Chabre M., Worcester D. Neutron diffraction studies of retinal rod outer segment membranes. — *Nature*, 1976, 262, 266—270.
32. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of membrane structure. — *Science*, 1972, 175, 720—731.
33. Steck T. L. The organisation of proteins in the human red blood cell membrane. — *J. Cell Biol.*, 1974, 62, 1—19.
34. Tomita M., Marchesi V. T. Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human glycophorin. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 2964—2968.
35. Treffers H. P. The viscosity-fluidity relations of proteins. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, 62, 1405—1409.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕМБРАН МЕТОДОМ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-СКАЛЫВАНИЯ

В. Л. БОРОВЯГИН, В. Г. ПЛАКУНОВА

*Институт биофизики АН СССР, Московский государственный университет, Москва, СССР*

Плазматическая мембрана *Halobacterium halobium*, содержащая 25% липидов и 75% бактериородопсина, являющегося единственным белком мембраны [13], изучена с помощью дифракции рентгеновских лучей [1, 2, 6] и различных методов электронной микроскопии [7, 8, 17—20].

Предложены модельные профили симметричного и асимметричного расположения молекул бактериородопсина по отношению к липидному бислою [1, 2, 6]. Недавно была предложена модель на основе данных, полученных с помощью метода электронной мик-

роскопии неокрашенных образцов [7]. В соответствии с этой моделью молекула бактериородопсина имеет размеры 2,5·3,5·4,5 нм, содержит 7 плотно упакованных  $\alpha$ -спиральных полипептидных сегментов и пронизывает плазматическую мембрану по всей толщине [7].

Поскольку в литературе отсутствуют данные о том, что молекулы бактериородопсина, образовавшиеся в темноте, локализованы в мембранных бляшках, мы исследовали две культуры *H. halobium* (H.h.), выращенные при различном освещении и с различным содержанием бактериородопсина. Кроме того, с помощью метода замораживания-скалывания-травления мы изучили красные фракции мембран и суспензию фрагментов мембран, полученную при спонтанном лизисе клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Условия выращивания

Культуры H.h R<sub>1</sub> выращивали в темноте или под флюоресцентными лампами (6000 лк) в стандартной среде с добавлением 0,1% экстракта дрожжей и 0,2% нитрата аммония. Культуры были использованы в ранних стадиях роста. Количество пурпурного комплекса определяли с помощью дифференциальной спектрофотометрии по методу Плакуновой [15] и с помощью непосредственного выделения по методу, предложенному Oesterhelt и Stoerkenis [14]. Супернатант среды и бактерии после центрифугирования исследовали по методу замораживания-скалывания.

Фракции пурпурных мембран выделяли по стандартной методике [13] следующим образом: мембраны переносили из сахарозного градиента в 25% раствор хлорида натрия и после центрифугирования суспендировали в 25% глицерине. Липофилизированные в стандартных условиях мембраны затем суспендировали в дистиллированной воде, центрифугировали и суспендировали в 25% глицерине.

### Электронная микроскопия по методу замораживания-скалывания-травления

Суспензии бактерий и мембран в 25% глицерине после предварительной инкубации в течение 15 мин при 25° С или при -10° были заморожены на медной фольге в фреоне-22 и быстро погружены в жидкий азот, а затем в специальную ячейку, что позволяет одновременно скалывать и затенять 8 разных образцов. Скалывание и затенение образцов производили с помощью ячейки типа JEOL в вакууме  $2 \cdot 10^{-7}$  торр и при температуре от -100 до -150° С с травлением или без него в течение 1—5 мин. Реплики исследовали с помощью электронного микроскопа JEM 7A.

Оптическая дифракция по методу, предложенному Klug, De Rosier [11] и оптическая фильтрация по методу, предложенному Klug, Berger [10], изображений Р и Е поверхностей сколов бляшек на негативах, полученных при изучении с помощью электронного микроскопа, были приготовлены в лаборатории, руководимой Н. А. Киселевым (Институт кристаллографии, Москва), для получения более надежных характеристик периодичности поверхностей сколов бляшек.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано существование связи между содержанием бактериородопсина в «темных» и «светлых» бактериях и числом бляшек в их мембранах. Зоны бляшек по площади в «светлых» бактериях в  $3\frac{1}{2}$ —4 раза больше, чем у «темных». Это может означать, что бактериородопсин, образующийся в темноте, локализован в бляшках мембраны также, как и в «светлых бактериях».

Изучение суспензий фрагментов мембран методом замораживания-скалывания показывает, что во время спонтанного лизиса клеток бляшки отделяются от мембраны (рис. 93), некоторые фрагменты плазматической мембраны присоединены на периферии спонтанно отделившихся бляшек. Замораживание-скалывание лиофилизированных мембран после их регидратации показывает, что бляшки остаются в тесно упакованных агрегатах, если время между высушиванием и регидратацией составляет 15—24 ч (рис. 94 и 95). Более выраженные образцы гексагональной структуры поверхности скола бляшек можно всегда увидеть в мембранах, суспендированных в 25% растворе хлорида натрия (рис. 96 и 97).

При использовании метода замораживания-скалывания подтверждаются ранее опубликованные данные [2], что Р и Е поверхности скола *H. h.* плазматической мембраны содержат асимметрично расположенные частицы (5000 и 1000 частиц на  $1 \text{ м}^2$ ) и бляшки (рис. 98 и 99).

Охлаждение бактерий до  $-10^\circ \text{C}$  не влияет на распределение частиц в Р и Е проекциях скола мембраны (рис. 93 и 97). В разных лабораториях [9, 12, 21] было показано, что фосфолипиды плазматической мембраны *H. halobium*  $R_1$  содержат только разветвленные углеводородные цепи дигидрофитанола. Это подтверждает данные Haest и соавт. [5] о том, что присутствие разветвленных углеводородных цепей в липидах мембран бактерий ингибирует структурные изменения проекций скола мембраны в результате термического фазового перехода липида.

Наши эксперименты показали, что разрешение реплик бляшек зависит от ориентации их поверхности по отношению к источнику тени. Принимая во внимание длину тени частицы, мы обнаружили, что уровень контрастности на Р сколе бляшек ниже, чем в





Рис. 93. Реплика Р-проекции скола пурпурной мембраны *H. halobium*. Получена из супернатанта среды роста (в 25% NaCl) «светлых» бактерий, охлаждение при  $-10^{\circ}\text{C}$ , репликация при  $-150^{\circ}\text{C}$ , негативная печать; ув. 160 000.

Рис. 94, 95, 96. Реплики пурпурных мембран. Фракции регидратировали в дистиллированной воде  $1\frac{1}{2}$  ч (рис. 94) и 48 ч (рис. 95, 96) после люофилизации «светлых» бактерий. Бляшки на рис. 96 были переведены из сахарозного градиента в 25% NaCl. Охлаждение от  $+25^{\circ}\text{C}$ , репликация при  $-150^{\circ}\text{C}$ . Ув.: рис. 94—40 000, рис. 95—100 000, рис. 96—200 000.



Рис. 97. Р-проекция скола плазматической мембраны и бляшка (стрелка). Бактерии суспендировали в 25% NaCl. Охлаждение с  $-10^{\circ}\text{C}$ , репликация при  $-150^{\circ}\text{C}$ , негативная печать: ув. 160 000.

Рис. 97а. Оптическая дифракция Р-проекции скола бляшки, представленной на рис. 97.

центре частиц на поверхности скола плазматической мембраны (рис. 97, 98, 100 и 101). Этот эффект наблюдали также, когда скалывание и оттенение производили при  $-100-150^{\circ}\text{C}$  (рис. 100 и 97).

Травление в течение 1—5 мин и последующее оттенение при  $-100-150^{\circ}\text{C}$  практически не изменяет вид скола: отсутствует четко выраженный край на периферии бляшки по сравнению с центром частиц плазматической мембраны (см. рис. 101). Наиболее удовлетворительное разрешение структуры бляшек было достигнуто при охлаждении суспензии от  $-10^{\circ}\text{C}$  и последующем скалывании и оттенении при  $-150^{\circ}\text{C}$  (см. рис. 93 и 97).

Проекция E скола бляшки не содержит никаких частиц и ее уровень яркости тот же, что и у плазматических мембран с меньшим числом частиц (см. рис. 99, показано стрелкой, и рис. 102). Когда репликацию проводят при  $-150^{\circ}\text{C}$  на проекции E скола бляшки выявляется слабая периодичность по трем направлениям под углом  $60^{\circ}$  (рис. 102). Эти линии периодичности исчезают через 2—3 мин травления или при оттенении при  $-100^{\circ}\text{C}$ .

Признаки оптической дифракции проекции P сколов бляшек указывают на гексагональные рефлексии с периодичностью  $60^{\circ}$  во

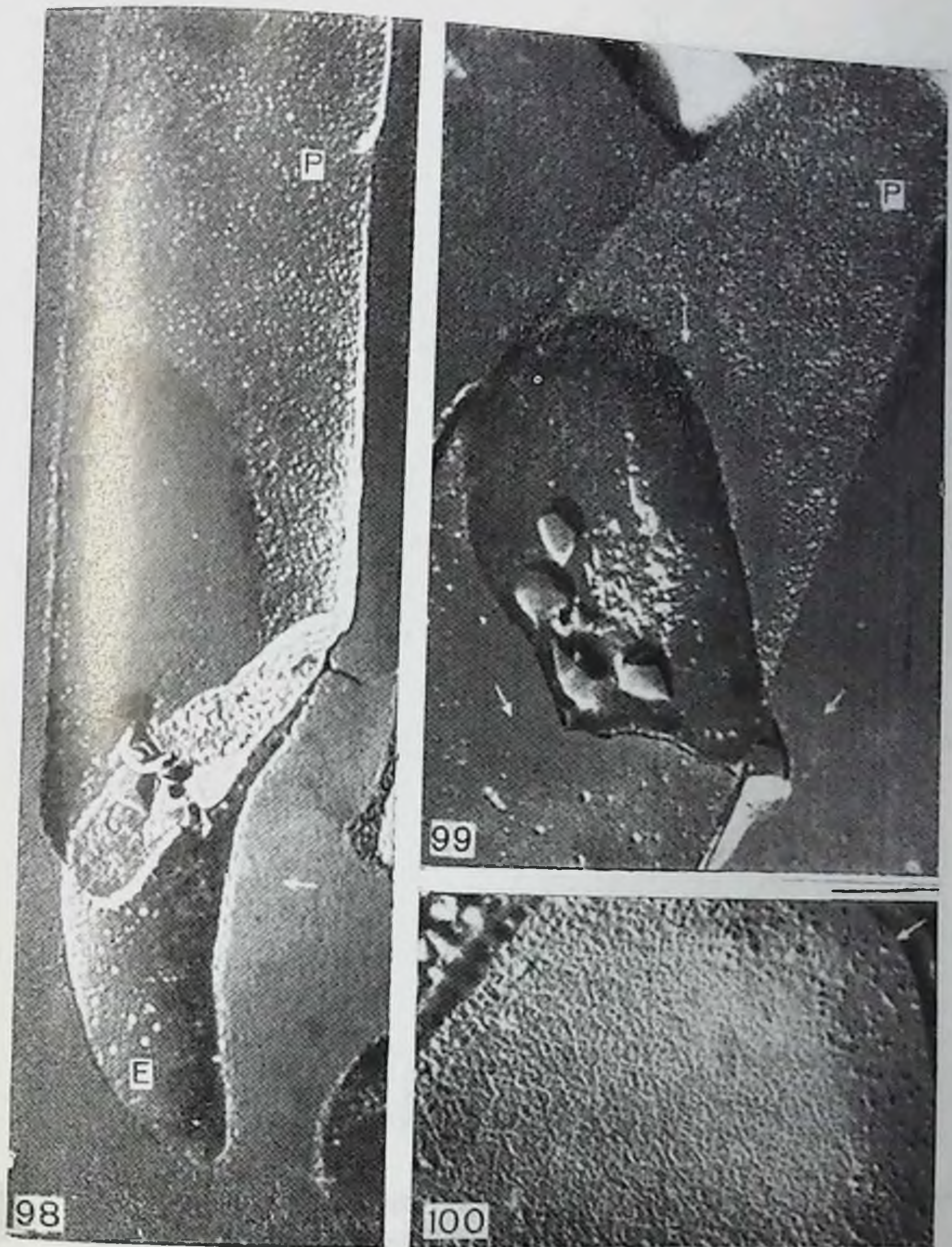


Рис. 98, 99. Р- и Е-проекция скола плазматической мембраны *H. halobium*, бляшки (стрелки) и внутриклеточные вакуоли (двойные стрелки). Среда роста с 25% NaCl. Охлаждение с  $+25^{\circ}$ , репликация при  $-140^{\circ}$ С, негативная печать; ув.: рис. 98—75 000, рис. 99—90 000.

Рис. 100. Р-проекция скола плазматической мембраны *H. halobium* и бляшки (стрелка). 25% NaCl, репликация при  $-100^{\circ}$ С; ув. 120 000.

всех классах, кроме тех, с которых реплики получали при  $-100^{\circ}$ С (см. рис. 97а).

Признаки дифракции Р сколов бляшек, полученные при  $-100^{\circ}$ С (с травлением или без него) указывают в основном на те же гексагональные рефлексы, но иногда одна из пар рефлексов не видна. Как было недавно показано в нашей лаборатории в от-



Рис. 101. То же, что на рис. 100, но репликация идет при  $-150^{\circ}\text{C}$  после травления в течение 5 мин. Ув. 160 000.

пошению мембран *S. faecalis* и *M. lysodeikticus*, это может быть обусловлено недостаточным разрешением рельефа бляшки как результата частичной деформации при оттовлении в условиях более высокой температуры ( $-100^{\circ}\text{C}$ ) [4].

Оптическая фильтрация изображения Р проекции скола бляшек предложенная Klug, Berger [10], при всех условиях (за исключением температуры  $-100^{\circ}\text{C}$ ) показывает, что элементарные ячейки фильтруемых образцов состоят из 4 субъединиц, локализованных в вершинах ромба с углом  $60^{\circ}$ . Каждая субъединица ромба представляет собой группу из 3 молекул бактериородопсина, объединенных вокруг осей 3-го порядка, расположенных в углах ромба. Эти данные согласуются с результатами, получен-



Рис. 162. E-проекция плазматической мембраны *H. halobium* и бляшка 25% NaCl, охлаждение с  $-10^{\circ}\text{C}$  и репликация при  $-150^{\circ}\text{C}$ . Заметна слабая периодичность вдоль трех направлений реплики бляшки; ув. 150 000.

ными при электронной микроскопии неокрашенных пурпурных мембран при большем разрешении [20].

В структурной модели бактериородопсина, предложенной на основе данных рентгеноструктурного анализа [13] и электронной микроскопии неокрашенных образцов [19], большая часть молекул бактериородопсина должна пронизывать бляшки липидного бислоя. Довольно хорошо известно, что внутримембранные частицы (ВМЧ) представляют собой глобулярный белок, находящийся внутри неполярной части липидного бислоя. Глобулярные белки тесно связаны с внутренней или внешней областью поверхности мембраны.

В отношении мембран *H. halobium* большая часть молекул ВМЧ связана с цитоплазматической половиной мембраны. Решетка бактериородопсина — липид также связана с цитоплазматической половиной бляшки.

При расколе мембраны вдоль центра липидного бислоя молекулы бактериородопсина должны образовать такой уровень яркости на проекции Р скола бляшки, который должен быть по меньшей мере эквивалентным уровню, даваемому верхними частями компонентов окружающей плазматической мембраны (если молекулы бактериородопсина не расщепляются вдоль центра). Кроме того, в этом случае молекулы бактериородопсина должны иметь желобый «след», как и желобок на проекции Е скола. Однако желобка не наблюдается при различных условиях репликации.

Если молекулы белка расщепляются вдоль центра липидного бислоя, обе половины решетки бактериородопсина — липид должны

образовать примерно одинаковые уровни яркости на проекциях Р и Е сколов бляшек. Однако наблюдаемый уровень на проекции Р ниже, чем уровень у вершущек частиц плазматической мембраны (см. рис. 97—101), что можно видеть на негативных отпечатках, и уровень яркости проекции Е скола бляшек тот же, что и у окружающих плазматических мембран (рис. 102).

Наиболее вероятно, что при расщеплении пятна вдоль центра липидного бислоя большая часть полипептидов бактериородопсина остается в цитоплазматической половине бляшки и только полипептидные «хвосты» остаются включенными во внешнюю половину. Более низкий уровень яркости решетки наблюдается на проекции Р скола бляшки в связи с тем, что число молекул липида на молекулу белка здесь намного меньше, чем в окружающей плазматической мембране.

При снятии реплик может произойти небольшая деформация молекул бактериородопсина. Она должна сопровождаться значительным искажением расположения полипептидов бактериородопсина. Однако данные об оптической дифракции и фильтрации указывают на то, что параметры регулярности субъединиц совпадают с аналогичными характеристиками, определенными другими методами [17].

Следовательно, яркость проекций Р и Е сколов бляшек можно связать с предположением, что большая часть полипептидов бактериородопсина расположена на внутренней половине бляшки. Концы пептидных сегментов (пептидные «хвосты») могут быть включены в противоположный липидный монослой. В этом случае более низкий уровень яркости Р проекции скола бляшки соответствует низкому содержанию липида: известно [5], что липиды мембран включаются в образование уровня яркости скола мембраны. Эта точка зрения в настоящее время подтверждается прямыми экспериментальными данными [3, 4, 16], из которых становится ясно, что ВМЧ состоят в основном из липидной оболочки (или микролипидного домена) с некоторым количеством белка внутри [16].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом замораживания-скалывания показано, что бактериородопсин, образованный в темноте, так же как и «светлые» молекулы, расположен в бляшках плазматической мембраны бактерий *N.h.* Было показано, что пурпурные мембранные бляшки остаются в плотных многослойных кластерах, если лиофилизированные образцы суспендируют в дистиллированной воде не менее чем через 24 ч после высушивания. Из данных по изучению сколов бляшек интактных бактерий при различных условиях получения реплик было сделано заключение, что большинство полипептидных цепей молекул белка должно быть расположено во

внутренней половине мембраны и только концевые полипептидные «хвосты» молекул бактериородопсина могут пронизывать всю толщину пурпурной мембраны.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blaurock A. E.* Bacteriorhodopsin: A transmembrane pump containing  $\alpha$ -Helix. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 93, 139—158.
2. *Blaurock A. E., Stoeckenius W.* Structure of the purple membrane. — *Nature New Biol.*, 1971, 233, 152—155.
3. *Borovjagin V. L.* Electron microscopy studies of cell membranes. VINITI, General Reviews on Science (1973—74). — *Biophysica*, 1975, 4, 226—287.
4. *Borovjagin V. L., Severina E. P., Tarakhoskii Yu. S.* On interpretation of hydrophobic intermembrane structures. — *Dokl. USSR Acad. Sci.*, 1976, 227, 1228—1230.
5. *Haest C. W. N., Verkleij A. J., De Gier S., Scheer R., Ververgaert P. H. J., Van Deenen L. L. M.* The effect of lipid phase transitions on the architecture of bacterial membranes. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 356, 17—26.
6. *Henderson R.* The structure of the purple membranes from *Halobacterium halobium*. Analysis of the X-ray diffraction pattern. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 93, 123—138.
7. *Henderson R., Unwin P. N. T.* Three dimensional model of the purple membrane obtained by electron microscopy. — *Nature*, 1975, 257, 28—32.
8. *Hwang S. B., Stoeckenius W.* Purple membrane vesicles: Morphology and proton translocation. — *J. Membr. Biol.*, 1977, 33, 325—350.
9. *Kates M., Palameta B., Joo C. N., Kushner D. J., Gibbons N. E.* A lipathic diether analog of glyceride-driven lipids. IV. The occurrence of di-O-dihydrophytylglycerol ether containing lipids in extremely halophilic bacteria. — *Biochemistry*, 1966, 5, 4092—4112.
10. *Klug A., Berger J. E.* An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs and some observations on the mechanism of negative staining. — *J. Mol. Biol.*, 1964, 10, 565—569.
11. *Klug A., De Rosier D. J.* Optical filtering of electron micrographs reconstruction on one-sided images. — *Nature*, 1966, 212, 29—32.
12. *Kushwaha S. C., Kates M., Martin W. G.* Characterization and composition of the purple and red membranes from *Halobacterium halobium*. — *Can. J. Biochem.*, 1975, 53, 284—292.
13. *Oesterhelt D., Stoeckenius W.* Rhodopsin-like protein from purple membrane of *halobacterium halobium*. — *Nature New Biol.*, 1971, 233, 149—152.
14. *Oesterhelt D., Stoeckenius W.* Functions of a new photoreceptor membrane. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 2853—2857.
15. *Plakunova V. G.* Reversible thermal bleaching of bacteriorhodopsin membrane complex, 1976 (Unpublished).
16. *Robertson J. D.* On the nature of intermembrane particles. USA Electron Microscopy Soc., Membrane Symposium (Boston), 1977 (in press).
17. *Robertson J. D., Schreil W.* Studies of the purple membrane of *Halobacterium halobium*. — *Anat. Rec.*, 1977, 187, 695—696.
18. *Stoeckenius W., Kunau W. H.* Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelope of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. — *J. Cell. Biol.*, 1968, 38, 337—357.
19. *Stoeckenius W., Rowen R.* A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. — *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 365—393.
20. *Unwin P. N. T., Henderson R.* Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 94, 425—440.
21. *Vaver V. A., Ushakov A. N., Cirenina M. L.* Bacteriorhodopsin phospholipids. — *Abstr. Int. Cong. Biophys. (Copenhagen)*, 1975, 104.

## СОПРЯЖЕННЫЙ ЛИТИЙ-НАТРИЕВЫЙ ОБМЕН В ЭРИТРОЦИТАХ БЫКА

ЙОРГЕН ФУНДЕР, ЙЕНС ОТТО ВЕЙЧ  
(JØRGEN FUNDER, JENS OTTO WIETH)

*Отдел медицинской физиологии А и отдел биофизики, Ханум институт,  
Университет Копенгагена, DK-220, Копенгаген, Дания*

О сопряженном литий-натриевом транспорте в эритроцитах человека впервые сообщили Duhm и Becker [4, 5]. Эритроциты быка обладают выраженной способностью к натриевому обмену [7] и в настоящем исследовании сделана попытка определить, может ли эта транспортная система опосредовать литий-натриевый обмен. Полученные результаты показывают, что литий легко обменивается на натрий через мембраны эритроцитов быка. Транспортная система идентична системе натриевого обмена, охарактеризованной Molais [7], и сродство к натрию и литию близко по значению аналогичному сродству в эритроцитах человека. Большая транспортная способность бычьих эритроцитов делает их очень удобным объектом для изучения механизма обмена.

### НАКОПЛЕНИЕ ЛИТИЯ, ПЕРЕНОСИМОГО ГРАДИЕНТОМ НАТРИЯ

Были проведены специальные эксперименты с целью определить, может ли градиент натрия быть источником энергии для переноса лития внутрь бычьих эритроцитов. Эритроциты быка содержат натрий концентрации от 50 до 90 мМ на 1 л внутриклеточной жидкости. Мембранный потенциал, вероятно, равен равновесному потенциалу для хлорида (около  $-10$  мВ при  $38^\circ\text{C}$ , pH 7,4), и в результате для натрия будет наблюдаться чрезмерный электрохимический градиент в том случае, если клетки с высоким содержанием натрия суспендируются в изотонической среде в присутствии KCl (рис. 103, А). Знак градиента меняется, когда клетки инкубируются в изотонической среде в присутствии NaCl (рис. 103, Б). На рис. 104, А показано быстрое внутриклеточное накопление лития в клетках, инкубированных в среде, содержащей KCl, в которой первоначально присутствовал 1 мМ  $\text{Li}^+$ .

Среда со 140 мМ KCl      Среда со 140 мМ NaCl

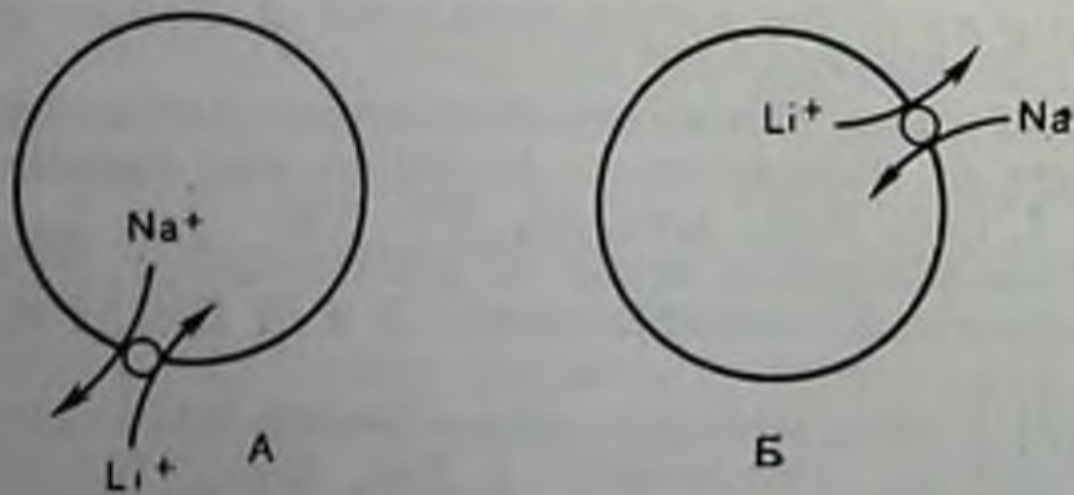


Рис. 103. Принципиальная схема литий-натриевого обмена в эритроцитах быка с высоким содержанием натрия. Ток лития может приводиться в движение электрохимическим градиентом натрия, когда клетки суспендируются в среде с KCl (без  $\text{Na}^+$ ) (А). Концентрацию лития можно поддерживать ниже равновесного значения, когда име-

ется направленный внутрь электрохимический градиент натрия. Экспериментальные данные представлены на рис. 104.



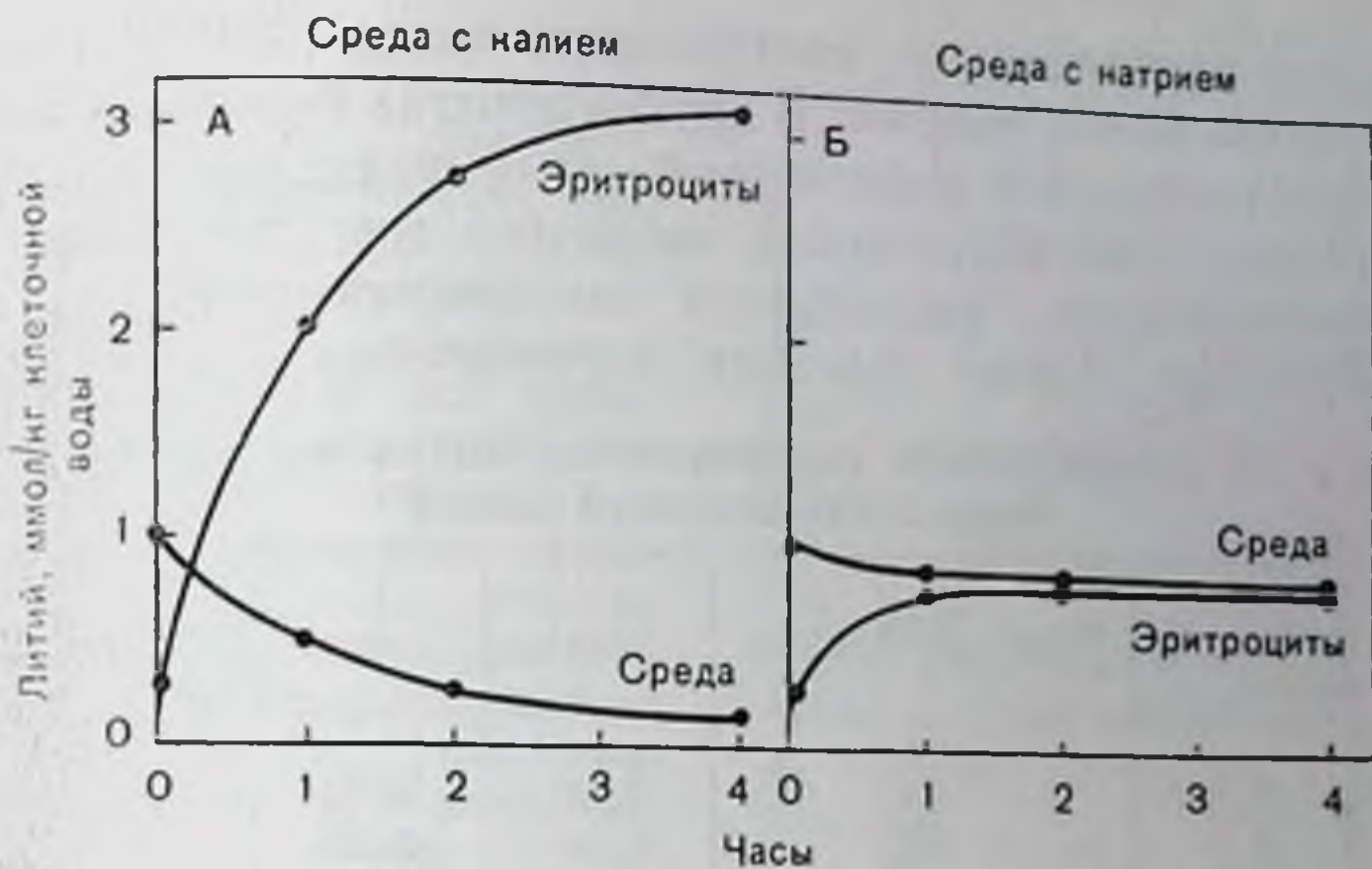


Рис. 104. Приток лития в эритроциты быка (ЭБ), суспендированные в среде со 140 мМ KCl (А) или 140 мМ NaCl (Б). Внутриклеточная концентрация натрия в клетках составила 90 ммол/кг внутриклеточной воды. Эксперименты проводили при 38° С, рН 7,4, в присутствии  $10^{-4}$  М уабанна. Все среды содержали 20 мМ глицилглициновый буфер, доведенный до нужного рН добавлением KOH или NaOH.

Клетки продолжали аккумулировать литий до соотношения  $L_i/L_o$ , соответствующего стационарному состоянию, равному примерно 25, что достигается через 4 ч. Наоборот, стационарное значение соотношения лития приближалось к единице, если клетки суспендировали в среде, содержащей NaCl (рис. 104, Б). Литий накапливается в эритроцитах только при направленном наружу градиенте натрия. Пассивное распределение лития может привести к соотношению лития около 1,4 при мембранном потенциале — 10 мВ. Это значение не было достигнуто в экспериментах, показанных на рис. 104, Б, так как градиент натрия может поддерживать концентрацию внутриклеточного лития ниже концентрации электрохимического равновесия. Возможное действие системы активного натрий-калиевого транспорта на распределение лития исключалось путем обработки клеток уабанном — предосторожность, которая может быть действительно необходима ввиду низкой способности (емкости) системы активного транспорта в бычьих эритроцитах [7] и низкого сродства лития к внешним калиевым центрам системы Na/K транспорта [2]. На рис. 105 наглядно по-

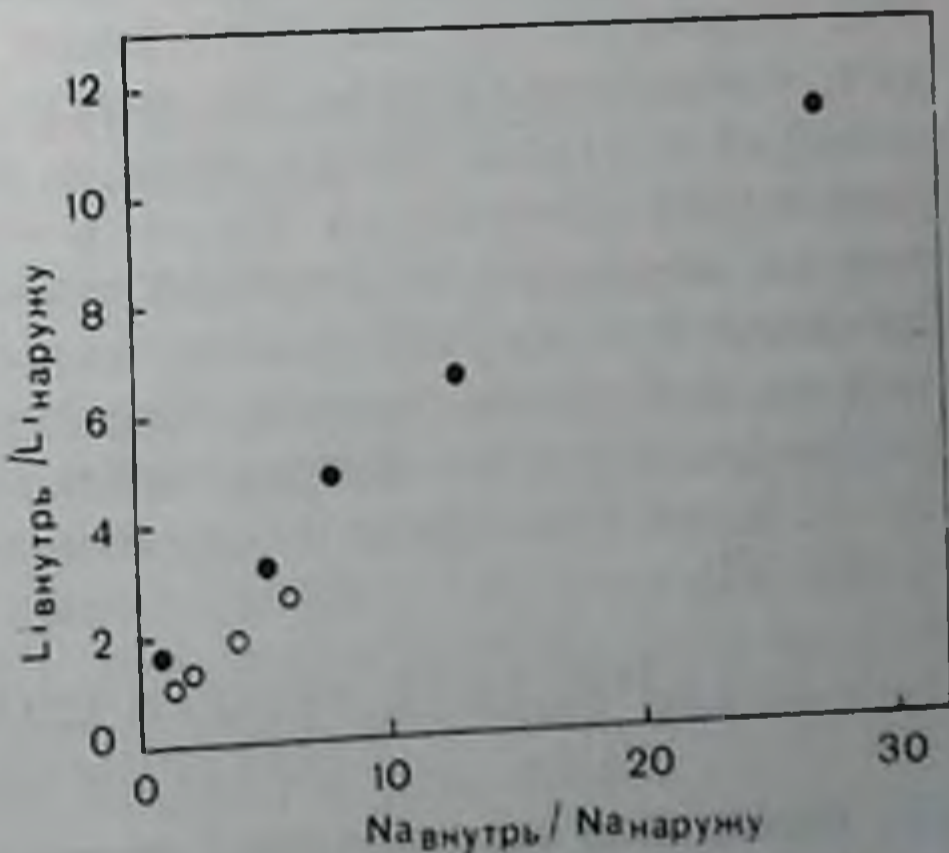


Рис. 105. Связь между отношением концентраций внутреннего и внешнего натрия и стационарным отношением распределения лития. Результаты получены на клетках двух животных.

казано, что стационарное соотношение лития ( $Li^i/Li_o$ ) является функцией градиента натрия. В других опытах было выявлено, что литий накапливался в количествах, указывающих на идеальное термодинамическое сопряжение, когда вся энергия градиента натрия, по-видимому, расходуется на литий-натриевый обмен (см. табл. 24). Такие высокие соотношения могут быть по-

Таблица 24. Стационарное распределение лития между эритроцитами быка и внесклеточной средой

$Na_{внутри}$	$Na_{наружу}$	$Na_{внутри}/Na_{наружу}$	$Li_{внутри}$	$Li_{наружу}$	$Li_{внутри}/Li_{наружу}$
87,2	3,0	29	2,20	0,49	4,5
79,3	3,1	26	2,65	0,36	7,4
51,9	1,9	27	1,24	0,12	10,0
88,8	3,8	23	2,96	0,19	16,0
89,7	1,6	57	3,10	0,13	24,0
99,7	2,0	50	1,97	0,06	33,0
54,0	1,4	39	1,62	0,04	41,0

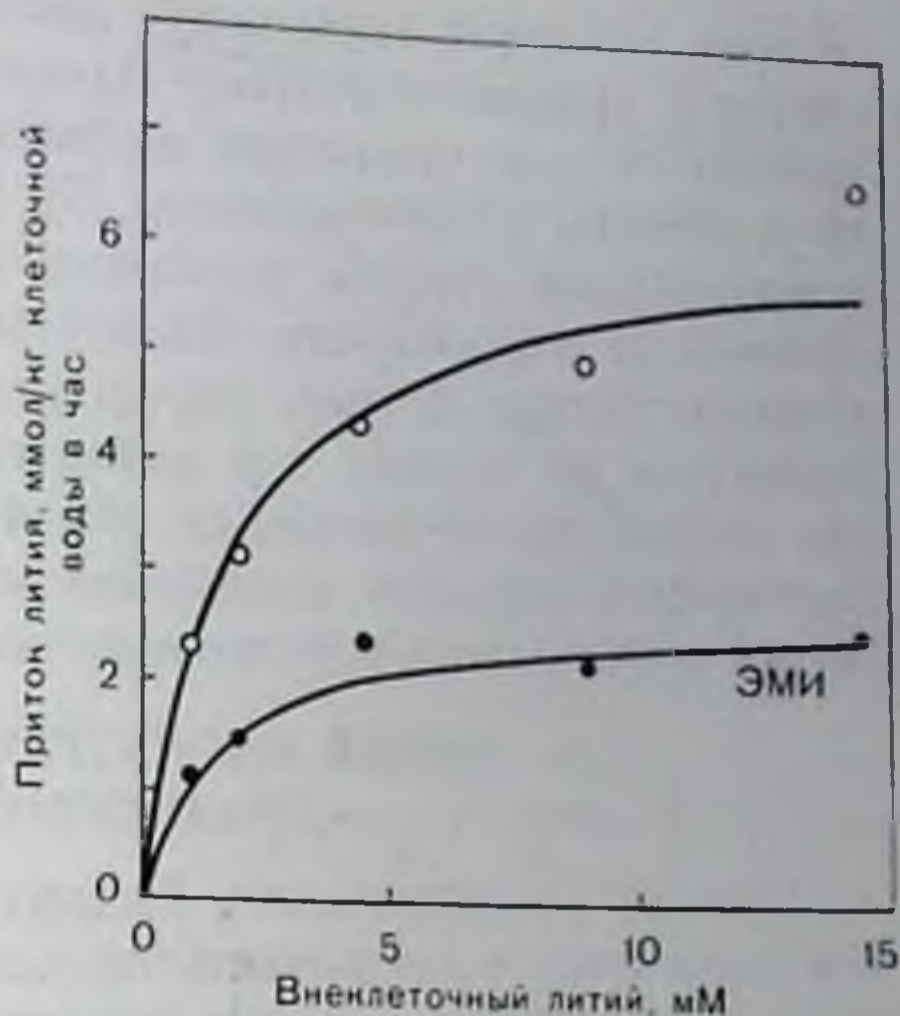
Примечание. Эксперименты проводили с эритроцитами, полученными от 7 коров, при 38 °С, рН 7,4 в 140 мМ КСl-среде, содержащей  $10^{-4}$  М убаина и 1 мМ LiCl, как и в эксперименте, приведенном на рис. 104, А. Гематокрит 35—45%; соотношение распределения натрия и лития определяли через 4 ч после начала инкубации.

лучены только при тесно сопряженном пассивном транспорте катионов, потому что бычьи эритроциты обладают необычайно низкой проницаемостью для электродиффузии катионов [7]. Результаты, приведенные в табл. 24, также свидетельствуют, что значительные вариации в соотношениях лития отмечали, когда пытались, насколько возможно, повысить это соотношение проведением опыта в среде, первоначально не содержащей натрия. Мы надеемся, что внутривидовые различия в соотношениях лития, показанные в табл. 24, можно отнести за счет небольших изменений в утечке ионов лития и натрия. Теоретически максимум отношения достигается только в том случае, если накопление лития не маскируется подобной утечкой. Такая интерпретация подтверждается тем, что емкость системы обмена натрия, ответственной за накопление лития, близка у эритроцитов разных быков, тогда как в утечке натрия наблюдаются существенные различия: 2—12% от тока общего самообмена натрия в среде, содержащей NaCl [7].

#### СРОДСТВО К ЛИТИЮ И ТРАНСПОРТНАЯ ЕМКОСТЬ СИСТЕМЫ ОБМЕНА

Начальная скорость тока лития при внешней концентрации его от 1 до 15 мМ была определена в среде, не содержащей натрия. Верхняя кривая на рис. 106 показывает, что перенос лития подчиняется простой кинетике Михаэлиса — Ментен с кажущейся концентрацией полунасыщения на внешней поверхности мембраны от 1,5 до 2 мМ. Вероятно, что сродство лития примерно в

Рис. 106. Ток лития в эритроциты быка, суспендированные в среде с 140 мМ КСl (без Na<sup>+</sup>), как функция внеклеточной концентрации Li (38° С, рН 7,4, убаши 10<sup>-4</sup> М). Соответствующие количества LiCl были добавлены в начале эксперимента для достижения концентрации лития, отложенной по оси абсцисс. Ток лития, который измеряли через 2-минутные интервалы, линейно возрастал во всех экспериментах в течение 4 мин. Сплошные кривые вычислены по уравнению Михаэлиса — Ментен в координатах Лайпуинвера—Берка. Максимальный ток лития ( $I_{\text{внутри}}^{\text{макс}}$ ) падает на 60% в присутствии  $3 \cdot 10^{-3}$  М ЭМИ с 6,5 до 2,8 ммоль/кг внутриклеточной воды в час.



Обработка ЭМИ не влияет на концентрацию лития, которая насыщает транспортную систему на 50% ( $K_{1/2}$ ) (1,9 мМ в отсутствие и 1,7 мМ в присутствии ЭМИ). В обоих случаях кривые выражаются уравнением:  $I_{\text{внутри}} = \frac{I_{\text{внутри}}^{\text{макс}}}{1 + K_{1/2}/C_L}$ , где  $C_L$  — концентрация лития в среде.

20 раз выше сродства натрия ( $k_{1/2} : 40$  мМ/л [7]). Эти значения для сродства лития и натрия к транспортной системе идентичны со значениями, опубликованными Duhm и Becker [3] для системы литий-натриевого обмена в эритроцитах человека. Максимальная емкость системы транспорта лития в бычьих эритроцитах составляет от 6 до 8 ммоль на 1 л внутриклеточной жидкости в час — значительно больше, чем емкость подобной системы у человека.

### ИНГИБИРОВАНИЕ КАТИОННОГО ОБМЕНА N-ЭТИЛМАЛЕИМИДОМ

Motais и Sola [8] в своих исследованиях по изучению влияния сульфгидрильных реагентов на самообмен натрия в бычьих эритроцитах показали некокурентное ингибирование N-этилмалеимидом (ЭМИ), который максимально ингибирует 60% самообмена. Аналогичный эффект был обнаружен и при изучении литий-натриевого обмена. Нижняя кривая на рис. 106 показывает, что максимальная емкость системы транспорта ингибируется на 60% без какого-либо влияния на кажущуюся константу полунасыщения транспортной системы (см. подпись к рис. 106).

Как было показано в опытах по определению начальной скорости тока лития, максимальная емкость системы литий-натриевого обмена составляет от 6 до 8 ммоль на 1 л внутриклеточной жидкости в час. Это значение ниже, чем ток натриевого самообмена, определенный Motais [7] и подтвержденный в наших исследованиях (от 10 до 12 ммоль/л). Нельзя исключить, что система

обмена катионов переносит литий со скоростью, меньшей, чем скорость переноса натрия. Однако невозможно провести точное количественное сравнение натриевого самообмена и литий-натриевого обмена. Molais сообщил [7], что кажущееся сродство натрия к внутренней стороне мембраны в 4 раза больше сродства к наружной ее поверхности. Хотя в наших опытах ток определяли в течение только 2 мин, внутренняя концентрация лития может подняться до уровня, где значительная доля транспортной системы занята литий-литиевым обменом. В любом случае результаты настоящего раздела поддерживают точку зрения, что натрий и литий обмениваются в соотношении 1 : 1.

### ОБЩИЙ ТОК НАТРИЯ, СОЗДАВАЕМЫЙ ГРАДИЕНТОМ ЛИТИЯ

Низкая проницаемость бычьих эритроцитов для натрия и лития позволяет использовать их для демонстрации того, что общий транспорт натрия против электрохимического градиента может создаваться градиентом лития. В опытах, приведенных в табл. 25,

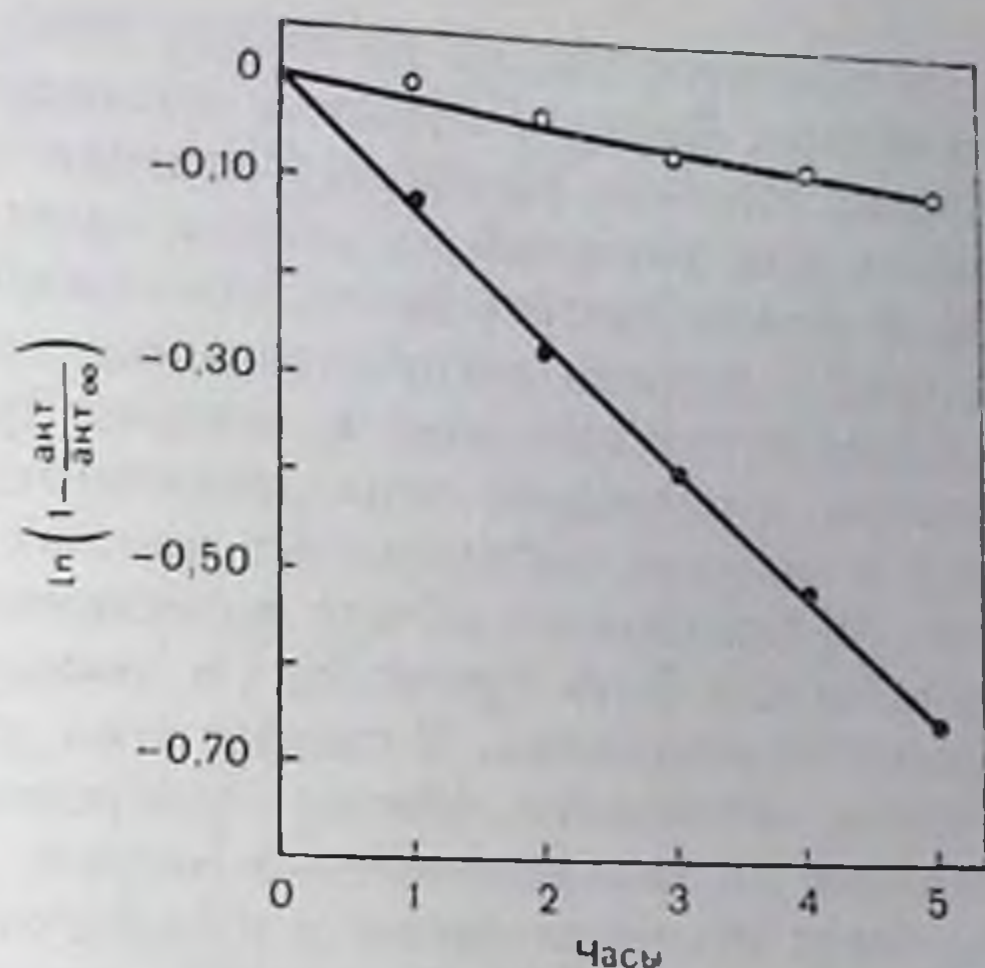
Таблица 25. «Чистый» ток натрия, приводимый в движение градиентом лития

Время, ч	Li <sub>наружу</sub>	Li <sub>внутри</sub>	Na <sub>наружу</sub>	Na <sub>внутри</sub>
	мм/л			
0	88	1,8	50	52,1
5	85	10,0	50	45,5
15	84	13,2	50	41,3
19	83	16,1	50	40,9
23	82	18,6	50	41,0

Примечание. Эритроциты быка инкубировали при 38 °С в среде, содержащей 90 мМ LiCl и 50 мМ NaCl, pH 7,4 с добавлением 20 мМ глицил-глицина. Активный транспорт натрия ингибировали 10<sup>-4</sup> М уабанна. Объем клеток оставался постоянным во время эксперимента, на что указывает постоянное содержание воды (62—63% по массе) во всех образцах. Мембранный потенциал в этих условиях был отрицательным, на что указывает постоянство распределения хлорида ( $Cl_{внутри} / Cl_{наружу}$ ), составляющее 0,63. Отметим, что «чистый» ток лития внутрь по направлению электрохимического градиента сопровождается эквивалентным током натрия против электрохимического градиента. Выход натрия прекращается, когда внесклеточная концентрация лития возрастает до значений, достаточных для блокирования транспорта натрия (см. рис. 107).

эритроциты с внутриклеточной концентрацией натрия 52 ммоль/л были суспендированы в среде с 50 мМ Na<sup>+</sup> и 90 мМ Li<sup>+</sup>. В результате того, что во время первых 15 ч инкубации клеток аккумулируют 11 ммоль лития в 1 л внутриклеточной жидкости при одновременном вытеснении 11 мМ натрия в среду, содержащую 10<sup>-4</sup> М уабанна, было предположено, что обмен идет 1 : 1. Эксперимент показал, что градиент лития можно использовать для создания общего транспорта натрия через мембрану против как электрического потенциала (около -10 мВ), так и концентрационного градиента (около 10 ммоль). Как показано в следующем

рис. 107. Влияние лития на самообмен натрия. Показана скорость освобождения  $^{22}\text{Na}$  из предварительно нагруженных клеток, инкубированных при гематокрите 1%, 38° С, pH 7,4, в среде, содержащей 140 mM NaCl (темные кружки) или 140 mM NaCl плюс 10 mM LiCl (светлые кружки), активность натрия в среде во времени отбора пробы,  $\text{акт}_\infty$  — специфическая активность изотонного равновесия. Скорость выхода  $^{22}\text{Na}$  в присутствии 10 mM Li по обе стороны мембраны ( $K = 0,2 \text{ ч}^{-1}$ ) составляет 15% от скорости выхода в отсутствие лития ( $K = 0,13 \text{ ч}^{-1}$ ). Соответствующие однонаправленные токи натрия составляли 1,5 и 10,9 ммоль/кг внутриклеточной воды в час. Активный транспорт натрия ингибируется убаином ( $10^{-4} \text{ M}$ ). Клетки без Li (темные кружки) содержат 84 ммоль Na/кг внутриклеточной воды, клетки с Li (светлые кружки) — 10 ммоль Li и 77 ммоль Na/кг внутриклеточной воды в час. Внутриклеточная вода составляет 65% по объему.



разделе, литий очень эффективно конкурирует с натрием за механизм обмена и поэтому не удивительно, что движение натрия останавливается, когда значительные количества лития поступают в клетку, вытесняя натрий из внутренних транспортных центров.

### ДЕЙСТВИЕ ЛИТИЯ НА САМООБМЕН НАТРИЯ

Как уже было отмечено, сродство натрия к системе катионного обмена примерно в 20 раз ниже сродства лития. Это было подтверждено тем, что литий является потенциальным ингибитором обмена натрия. На рис. 107 показаны результаты экспериментов, где был измерен натриевый самообмен в эритроцитах быка до и после нагрузки 10 mM лития. В присутствии 10 mM лития во внешней и внутриклеточной водной фазах ток самообмена ингибируется на 85% (с 11 до 1,5 mM/л). Было также обнаружено, что низкая внутриклеточная концентрация лития стимулирует утечку натрия в изотоническую среду, содержащую KCl. Однако это влияние является комплексным и с трудом поддается количественному анализу, так как утечка натрия быстро подавляется при повышении внутриклеточной концентрации лития и внешние катионные центры обменного механизма постепенно насыщаются ионами лития.

### ОТСУТСТВИЕ НАТРИЙ-КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА В ЭРИТРОЦИТАХ БЫКА

Полученные результаты позволяют предполагать, что транспортные системы, опосредующие сопряженный обмен натрия и лития в эритроцитах человека и быка, могут быть тесно связаны

и отличаются только по своему относительному содержанию в мембране. Видимо, подобные механизмы будут обнаружены и в других клетках. Концентрация явления «обменной диффузии» возникла при изучении натриевого транспорта в мышцах лягушки [6], и можно сделать вывод, что способность обменивать литий на натрий — широко распространенное свойство клеток. Другой механизм катионного обмена, который привлек к себе значительный интерес в последние годы, заключается в обмене натрия на кальций и впервые наблюдался в аксонах кальмара [1]. Parker и соавт. [9] предположили, что вытеснение натрия в эритроцитах собаки может быть приведено в движение направленным внутрь градиентом кальция. В связи с этим мы проверили, может ли механизм катионного обмена опосредовать обмен внеклеточного кальция на внутриклеточный натрий. Для этого бычья эритроциты были суспендированы в изотоническом растворе, содержащем KCl, 0,5 ммоль  $^{45}\text{Ca}$ . Суммарное движение натрия и радиоактивного кальция продолжалось в течение 4 ч, и в результате оказалось, что кальций не накапливается в клетках и что внеклеточный кальций не может вызвать дополнительный общий ток натрия из клеток. Было также обнаружено, что поглощение лития не ингибируется внеклеточным кальцием.

### ИНГИБИРОВАНИЕ ОБМЕННОЙ СИСТЕМЫ НАТРИЯ ИОНАМИ ВОДОРОДА И ФЛОРЕТИНОМ

Motais [7] установил, что самообмен натрия в эритроцитах быка ингибируется протонами. На рис. 108 показано, что соотношение литий-кальцевого обмена уменьшается при снижении pH, так, как и самообмен натрия. Флоретин является сильным ингибитором литий-натриевого обмена в эритроцитах человека. Мы обнаружили значительное снижение начальной скорости поглощения лития в эритроцитах быка. Результаты, приведенные на

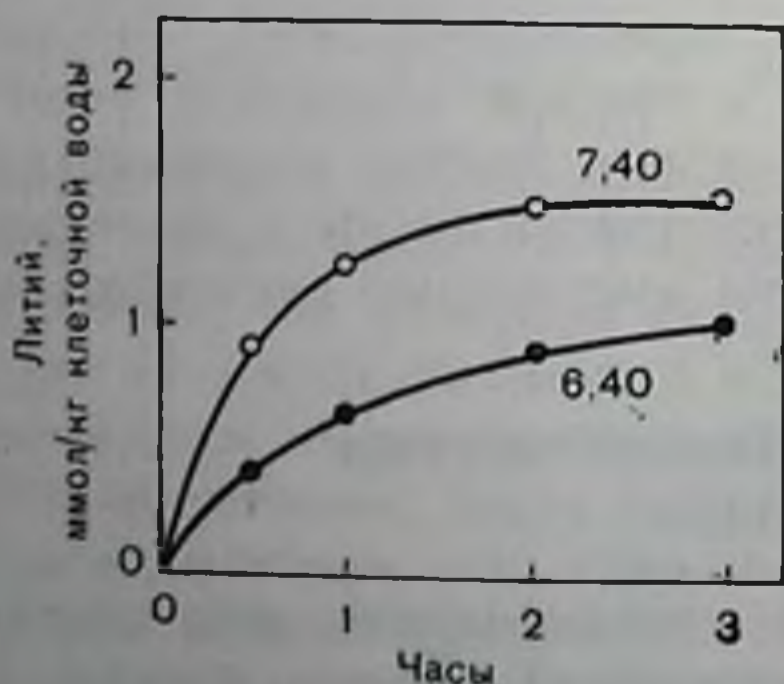


рис. 108. Ток лития при Na—Li-обмене при pH 7,4 и 6,4 ( $38^\circ\text{C}$ ,  $10^{-4}\text{M}$  уабаппа). Клетки были уравновешены соответствующим pH, инкубировали при гематокрите 40% в среде с 140 mM KCl и 1 mM NaCl. Начальная скорость поглощения лития составляла примерно половину при низком pH по отношению к скорости, полученной Motais [7] для Na—Na-обмена. Клетки умеренно набухали при низких pH, содержание воды в них составляло 64 и 67% по объему. Наименьшее поглощение лития клетками при низком pH сопровождалось соответствующим замедлением освобождения лития из клеток, на что указывал подъем внеклеточной концентрации натрия.

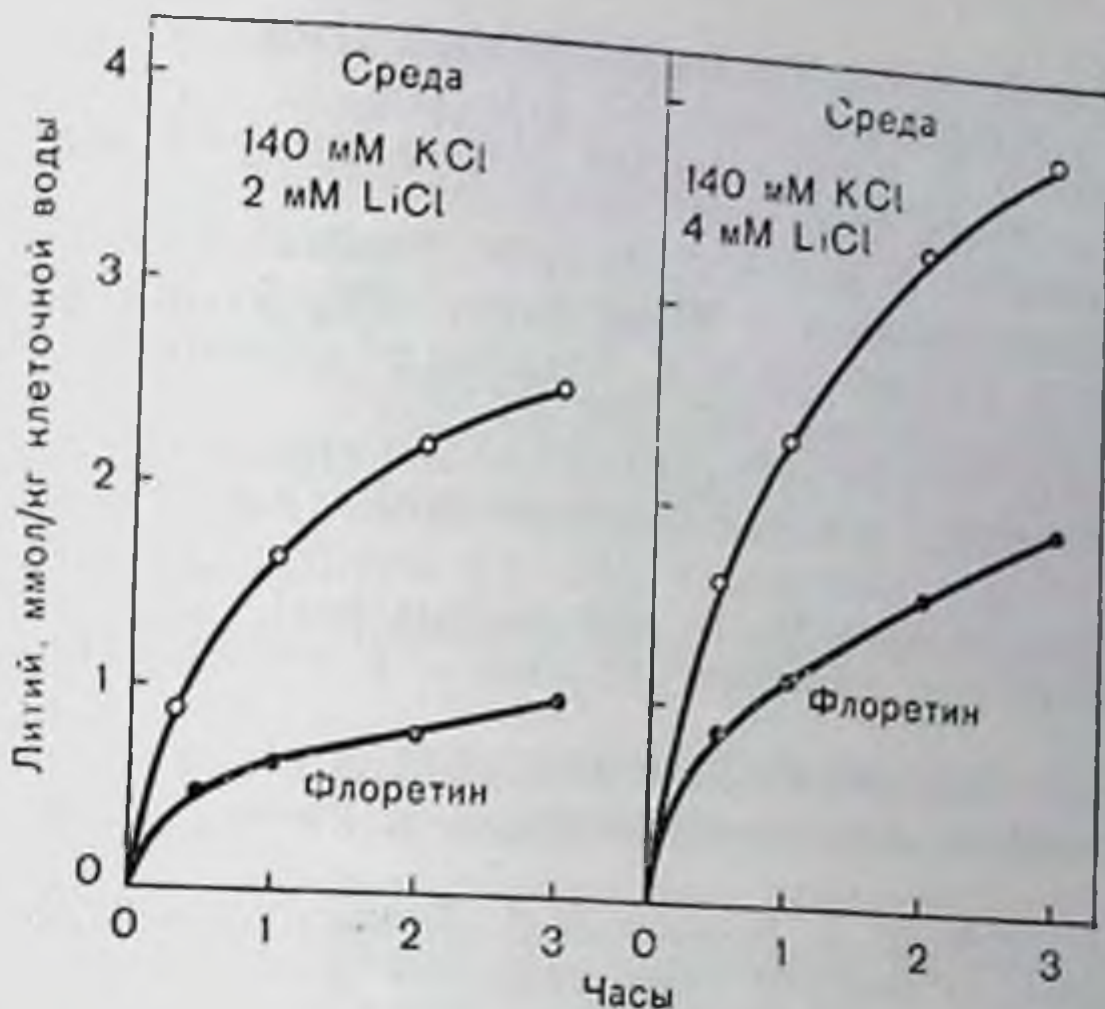


Рис. 109. Эффект ингибирования флоретином входного тока лития путем Na—Li-обмена (pH 7,4 38 °C,  $10^{-4}$  M убаина). Клетки инкубировали при гематокрите 40% в среде, содержащей 140 mM KCl и 2 или 4 mM LiCl в присутствии или в отсутствие 0,2 mM флоретина. Клетки для эксперимента с флоретином 4 раза промывали средой с низким гематокритом с флоретином для достижения равновесия по флоретину перед началом эксперимента.

рис. 109, показывают, что ингибирование происходит не до конца, хотя клетки находятся в равновесии с почти насыщенным раствором флоретина (0,2 mM).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эритроциты быка могут опосредовать тесно сопряженный литий-натриевый обмен. Свободная энергия градиента натрия может быть направлена на перенос лития наружу и наоборот. Сопряжение является очень эффективным, и в клетках с небольшой утечкой катионов можно увеличить концентрацию внутриклеточного лития до значений, в 40 раз превышающих внеклеточную концентрацию. Отношение к ингибиторам (протоны и N-этилмаленимид) и ингибирующее действие ионов лития на самообмен натрия соответствует представлению, что транспорт лития опосредован системой обмена натрия, подробно изученной Motais [7]. Сродство этой транспортной системы к внеклеточному натрию ( $K_{1/2} = 40$  mM) и литию ( $K_{1/2}$  от 1 до 2 mM) не отличается от значений аналогичного сродства в эритроцитах человека. Максимальная транспортная емкость по меньшей мере на порядок выше, чем в эритроцитах человека.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baker P. F., Blaustein M. P., Hodgkin A. L., Steinhardt R. A. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. — J. Physiol. (Lond.). 1969, 200, 431—458.

2. *Duhm J., Becker B. F.* Studies on the lithium transport across the red cell membrane II. — *Pflug. Arch.*, 1977, 367, 211—219.
3. *Duhm J., Becker B. F.* Studies on the lithium transport across the red cell membrane IV. — *Pflug. Arch.*, 1977 (in press).
4. *Duhm J., Eisenried F., Becker B. F., Greil W.* Studies on the lithium transport across the cell membrane. I. — *Pflug. Arch.*, 1976, 364, 147—155.
5. *Haas M., Schooler J., Tosteson D. C.* Coupling of lithium to sodium transport in human red cells. — *Nature*, 1975, 258, 425—427.
6. *Levi H., Ussing H. H.* The exchange of sodium and chloride ions across the fibre membrane of the isolated frog sartorius. — *Acta Phys. Scand.*, 1948, 16, 231—249.
7. *Motais R.* Sodium movements in high-sodium beef red cells: Properties of an ouabain insensitive exchange diffusion. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 233, 395—422.
8. *Motais R., Sola F.* Characteristics of a sulphhydryl group essential for sodium exchange diffusion in beef erythrocytes. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, 233, 423—438.
9. *Parker J. C., Gitelman H. J., Glosson P. S., Leonard D. L.* Role of calcium in volume regulation by dog red blood cells. — *J. Gen. Physiol.*, 1975, 65, 84—96.

### ИЗУЧЕНИЕ $\text{Na}^+$ -ЗАВИСИМОГО АНТИПОРТА $\text{Li}^+$ И СТИМУЛИРОВАННОГО БИКАРБОНАТОМ ТРАНСПОРТА $\text{Li}^+$ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

ЙОХЕН ДУМ, БЕРНАРД Ф. БЕККЕР  
(JOCHEN DUHM, BERNHARD F. BECKER)

*Институт физиологии Мюнхенского университета, Д-8000 Мюнхен 2, ФРГ*

Транспорт лития через мембраны эритроцитов человека привлек внимание исследователей только в последнее время в связи с тем, что обнаружено существенное различие стационарного распределения его между эритроцитами и плазмой у больных, получавших этот элемент [10, 17, 18, 22, 29]. Исследования Tosteson и соавт. [19, 26], Funder и Wieth [12—14, 34, 36] и нашей группы [5—8, 18] позволили достаточно точно установить, что существуют по меньшей мере четыре пути транспорта лития через мембрану эритроцитов человека:

- 1)  $\text{Na}^+$ -зависимая система антипорта  $\text{Li}^+$  [5—8, 17—19, 26];
- 2) слабый пассивный транспорт, стимулируемый бикарбонатом [6, 7, 12—14, 34, 36];
- 3) просачивание [6];
- 4)  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -насос [6, 9, 18, 26].

В настоящей статье мы ограничимся обсуждением первых трех путей.

#### $\text{Na}^+$ -ЗАВИСИМАЯ СИСТЕМА АНТИПОРТА ЛИТИЯ

Перенос  $\text{Li}^+$  с помощью  $\text{Na}^+$ -зависимой системы антипорта  $\text{Li}^+$  связан с эквивалентным обменом  $\text{Na}^+$  на  $\text{Li}^+$ . Система определяет верхнюю и нижнюю границы переноса в обоих направлениях в зависимости от распределения  $\text{Na}^+$  и  $\text{Li}^+$ . Система антипорта вместе с градиентом  $\text{Na}^+$ , являющимся движущей силой, ответст-



венна за более низкую концентрацию  $\text{Li}^+$  в эритроцитах по сравнению с плазмой в стационарном состоянии *in vivo* [5, 19].

Антипорт  $\text{Li}^+$  подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен, значения  $K_m$  для внутреннего и внешнего  $\text{Li}^+$  составляют около 1,5 мМ при концентрации  $\text{Na}^+$  10 мМ с той же стороны мембраны, что и  $\text{Li}^+$  [8]. Таким образом, система, по-видимому, симметрична по  $\text{Li}^+$ .  $\text{Na}^+$  и  $\text{Li}^+$  конкурируют за каналы транспорта, кажущаяся константа ингибирования  $K_i$  для внешнего  $\text{Na}^+$  около 30 мМ при 2 мМ внешнего  $\text{Li}^+$  [8]. Сродство для  $\text{Na}^+$  ниже, чем для  $\text{Li}^+$  более чем на порядок,  $K_m$  для внешнего  $\text{Na}^+$  около 50 ммоль [8].

Небольшая разница между кинетическими константами, определенными в нашей лаборатории, и данными, полученными Toeston, можно отнести за счет постановки эксперимента. Мы оценивали  $\text{Na}$ -зависимый антипорт  $\text{Li}^+$ , измеряя чистый перенос  $\text{Li}^+$ , нечувствительного к уабанну и диниридамолу. По этому методу антипорт слегка завышается, так как диниридамол блокирует только около 50% утечки  $\text{Li}^+$  [6]. Dr. Toeston и соавт. использовали метод флоретинчувствительного поглощения  $\text{Li}^+$ . Однако флоретин, кроме блокирования системы антипорта, ингибирует также бикарбонатный путь и частично утечку  $\text{Li}^+$  (см. далее). Кроме того, флоретин может увеличивать утечку  $\text{Li}^+$  по меньшей мере при концентрациях выше 0,2 мМ. Флоретинчувствительный транспорт  $\text{Li}^+$  может быть поэтому больше или меньше антипорта в зависимости от условий эксперимента. Оба метода оценки антипорта  $\text{Li}^+$  имеют погрешности, величина которых увеличивается при повышении концентрации  $\text{Li}^+$ .

На систему антипорта мало влияют холин,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , она не ингибируется дефицитом АТФ, уабанном, флоризином, SITS, амилоридом, диниридамолом [5, 6]. Систему можно полностью заблокировать 0,2 мМ флоретина [8, 26]. Мы обнаружили, что 0,5 мМ флорбензофенона и *N*-этилмаленимида одинаково эффективны [8].

### Внутривидовые различия в системе $\text{Na}^+$ -зависимого антипорта $\text{Li}^+$

Существуют значительные внутривидовые различия в максимальной транспортной способности антипорта  $\text{Na}^+ - \text{Li}^+$  [8, 17, 29]. Они не ограничиваются разницей в эритроцитах больных, страдающих эмоциональными расстройствами. Как показано на рис. 110, подобные различия также явно выражены в эритроцитах практически здорового человека. Значения общего поглощения  $\text{Li}^+$  за 1 ч из холин-хлоридной среды, содержащей 2 мМ  $\text{Li}^+$ , отложены на абсциссе. Поглощение  $\text{Li}^+$  определяли в присутствии 0,1 мМ уабанна (для ингибирования транспорта  $\text{Li}^+$  с помощью  $\text{K}-\text{Na}$ -насоса) и 0,05 мМ диниридамола (ингибирование бикарбонатного пути и утечки). При этих условиях поглощение  $\text{Li}^+$  относительно большое и измерение системы антипорта надежно

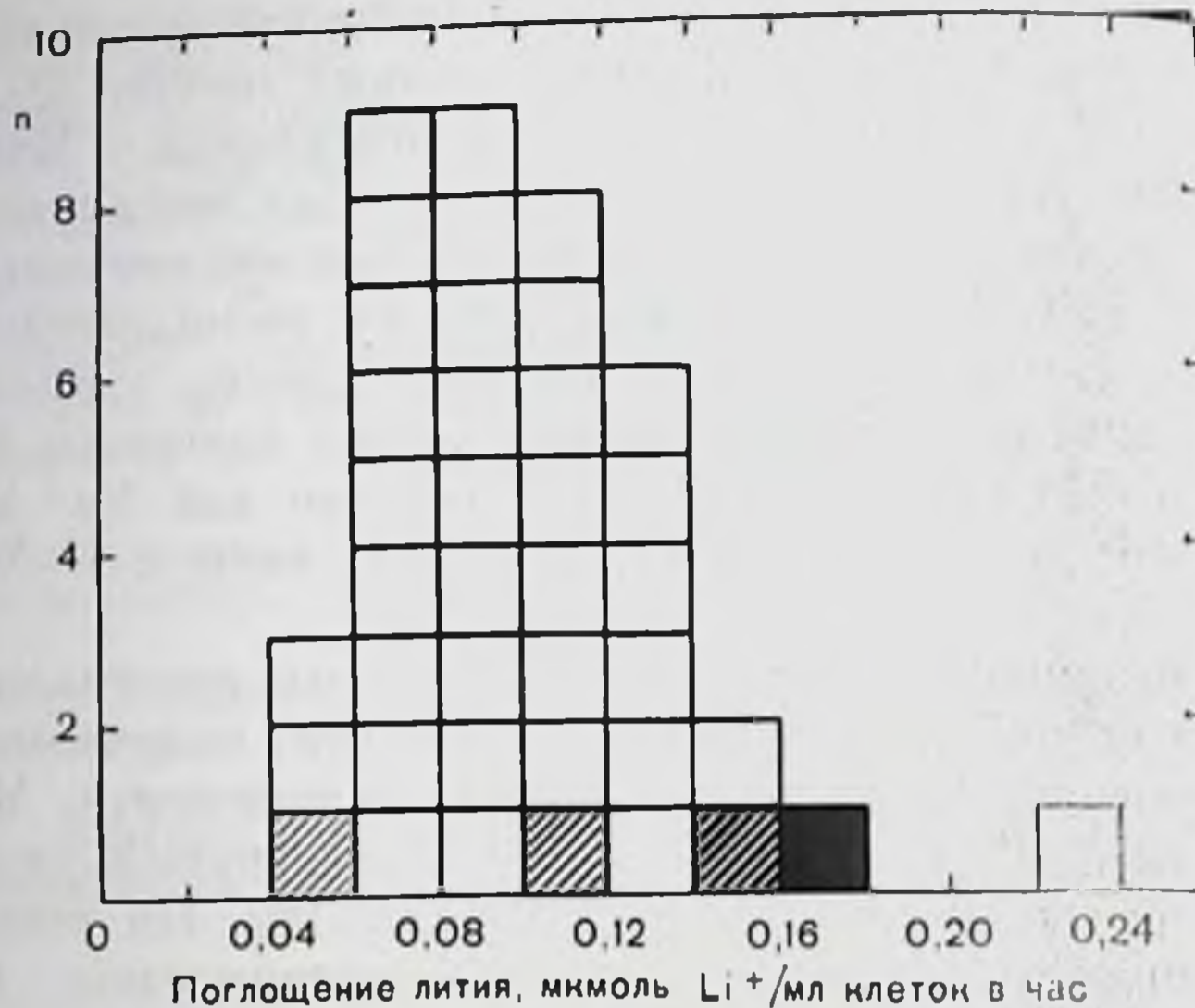


Рис. 110. Индивидуальные различия в системах  $\text{Na}^+$ -зависимого антипорта лития в эритроцитах 39 практически здоровых сотрудников мужского пола отделения физиологии Мюнхенского университета. Систему антипорта изучали, измеряя общее поглощение лития за 1 ч, устойчивое к совместному действию уабаина и диширидамола (среда: 140 мМ хлорида  $\text{Na}^+$ , 10 мМ  $\text{Na}^+$ , 2 мМ  $\text{Li}^+$ , 0,1 мМ уабаина, 0,05 мМ диширидамола; основной анион:  $\text{Cl}^-$  5 мМ глюкозы, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$  1 мМ неорганического фосфата, pH 7,4, 37° С, гематокрит 2%). Результаты, полученные на эритроцитах 4 доноров методом отщепления, показаны на рис. 111. В этом и во всех остальных экспериментах содержание лития в эритроцитах было скорректировано на постоянное содержание гемоглобина 5,2 мкмол/мл клетки (до тетрамера).

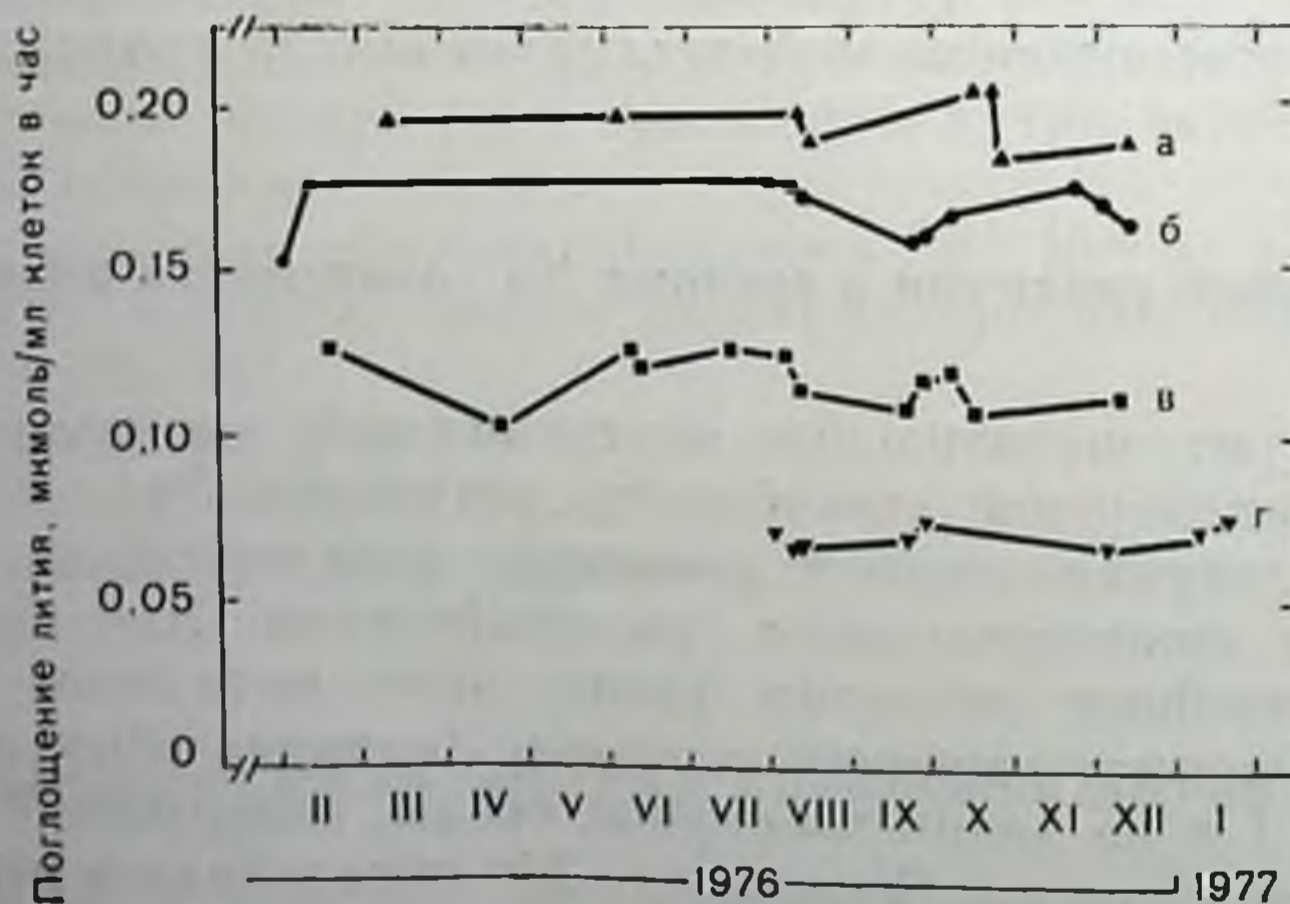


Рис. 111. Длительное исследование уабаинустойчивого поглощения лития эритроцитами 4 доноров, проведенное с помощью метода отщепления (см. рис. 110; условия эксперимента — рис. 110).

Доноры: а — У. Л., б — Дж. Д., в — В. Ф. Б., г — В. Р. Д.

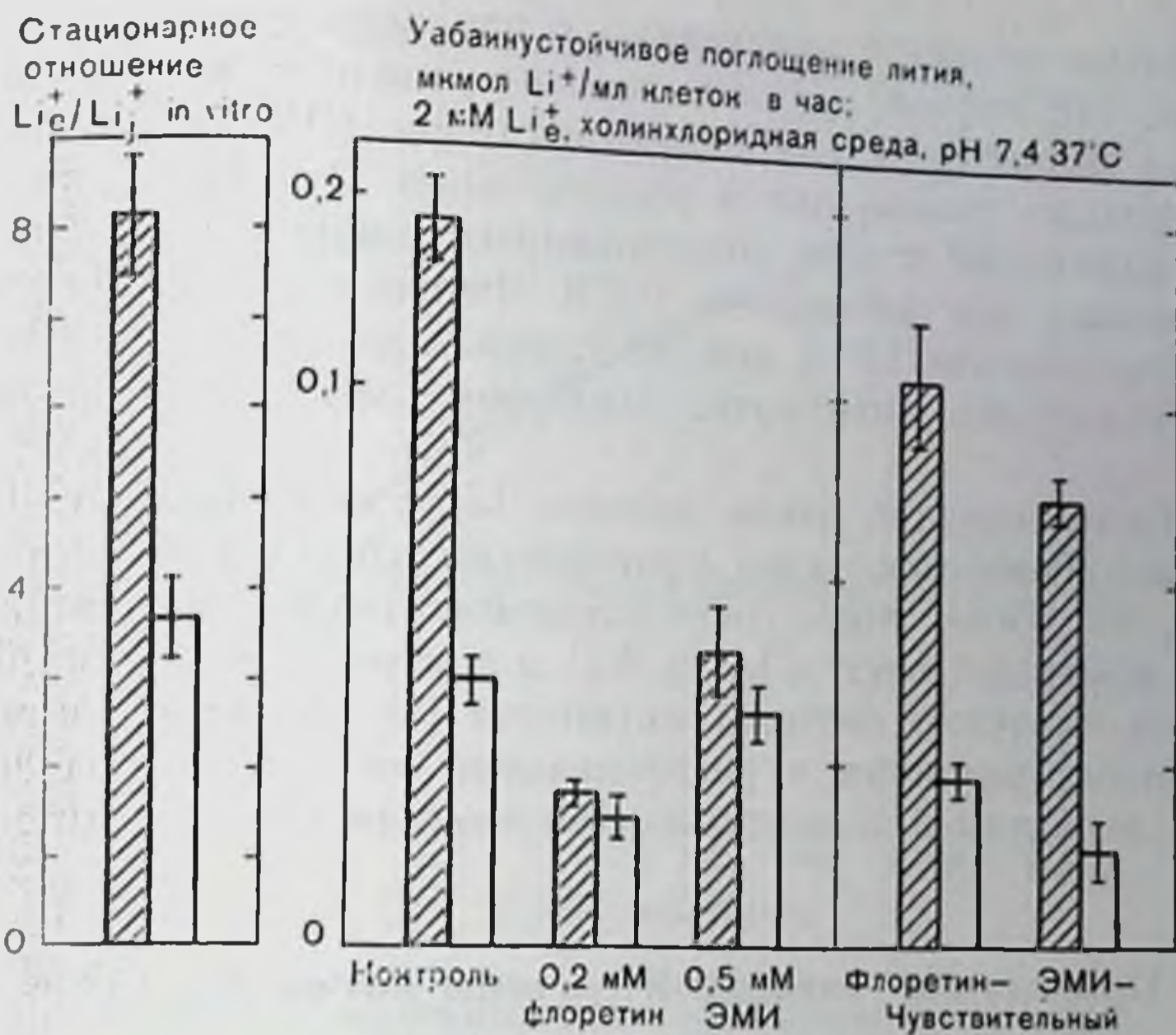


Рис. 112. Индивидуальные различия в стационарном коэффициенте распределения  $Li^+$  in vitro и в системе Na-зависимого антипорта  $Li$ . Коэффициенты распределения в стационарном состоянии были определены через 27 ч инкубации эритроцитов в среде, содержащей 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $LiCl$ , 5 mM глюкозы, 1 mM  $CaCl_2$  и 1 mM неорганического фосфата (pH 7,4, 37° C, гематокрит 2%). В клетки предварительно был введен литий до начальной концентрации 1 mM. Убавнустойчивое поглощение лития измеряли по методике, описанной в подписи к рис. 110. Приведены средние значения  $\pm$  SEM из 3—8 опытов. Заштрихованные столбцы — донор У. Д.; белые столбцы — донор Б. Р. Д.

(ограничения см. ранее). Частота распределения на рис. 110 была получена при анализе крови 39 наших сотрудников. Экстремальные значения различаются в 5 раз, т. е. больше, чем до сих пор наблюдались в эритроцитах больных с маниакально-депрессивным синдромом [17, 29].

Результаты длительного изучения системы антипорта эритроцитов представлены на рис. 111. Очевидно, что активность системы, определенная как убавнустойчивое поглощение лития, остается практически постоянной в течение более чем 9 мес, т. е. периода, более чем в два раза превышающего срок жизни клеток. Таким образом, результаты совпадают с точкой зрения, что активность системы антипорта эритроцитов определяется генетически [4].

На рис. 112 приведены результаты, полученные при изучении эритроцитов с максимальной и минимальной активностью (рис. 111). В среде с физиологическим набором катионов, но без добавления бикарбоната in vitro такие клетки дают крайне различное распределение по внешнему и внутреннему литию в стационарном состоянии (рис. 112, слева). Убавнустойчивое погло-

щение лития меняется аналогично с изменением его концентрации (рис. 112, справа). После полного ингибирования системы антипорта флоретнином или этилмаленимидом (ЭМИ), поглощение  $\text{Li}^+$  происходит только путем просачивания. Эти значения практически одинаковы у всех обследованных доноров и незначительно возрастают при добавлении ЭМИ. Флоретин- и ЭМИ-чувствительное поглощение  $\text{Li}^+$  в той же группе здоровых доноров, идущее по механизму антипорта, наоборот, меняется примерно в 3 раза.

Как было показано ранее, перенос  $\text{Li}^+$  с помощью  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -насоса и бикарбонатным путем практически одинаков у разных доноров [8, 18]. Более того, было продемонстрировано одинаковое сродство обменных систем  $\text{Li}^+$  и  $\text{Na}^+$  в эритроцитах с разной максимальной емкостью системы антипорта [8]. Таким образом, индивидуальные различия в распределении лития связаны исключительно с разницей в максимальной емкости системы антипорта  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$ .

### Природа $\text{Na}^+$ -зависимой системы антипорта $\text{Li}^+$

В дальнейшем мы развиваем гипотезу, что обмен  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  опосредован уабаиннечувствительной системой обмена  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$  (см. [8] и статью Funder и Wieth в настоящей книге).

В эритроцитах человека [30] и многих других тканях [2, 23, 24] имеется уабаиннечувствительный обмен  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$ . Обмен  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  также нечувствителен к уабаину. Вторым фактом в пользу нашей гипотезы является то, что  $\text{Na}^+$  замещает  $\text{Li}^+$  в центре переноса  $\text{Li}^+$  по конкурентному механизму [8].  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , холин практически не влияют на этот процесс [5]. В-третьих, уабаиннечувствительный обмен  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$  и  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  проявляет аналогичное сродство к  $\text{Na}^+$ ; в обоих случаях  $K_m$  для внешнего  $\text{Na}^+$  равно приблизительно 50 мМ [8]. Кроме того, обе системы подчиняются кинетике Михаэлиса — Ментен и опосредуют обмен один на один.

На рис. 113 показана зависимость активности системы обмена  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$  и  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  в условных единицах от внеклеточного рН. Пунктирная линия, отражающая рН-независимый рост активности  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$  системы эритроцитов быка, приведена по данным Molais [24]. Сплошная кривая представляет собой зависимость от рН  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  антипорта эритроцитов человека (см. также рис. 120). Обе кривые совпадают при рН 7,4. Из рисунка видно, что обмен  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$  и  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  проявляет практически одинаковую зависимость от рН.

При изучении действия SH-реагентов также отмечено сходство. Molais и Sola [25] показали, что ЭМИ в отличие от парахлормеркурибензосульфоната (ПХМБС) ингибирует около 50% уабаиннечувствительного обмена  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$  в эритроцитах человека. Аналогичные результаты были получены и для  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$ -системы (рис. 114).

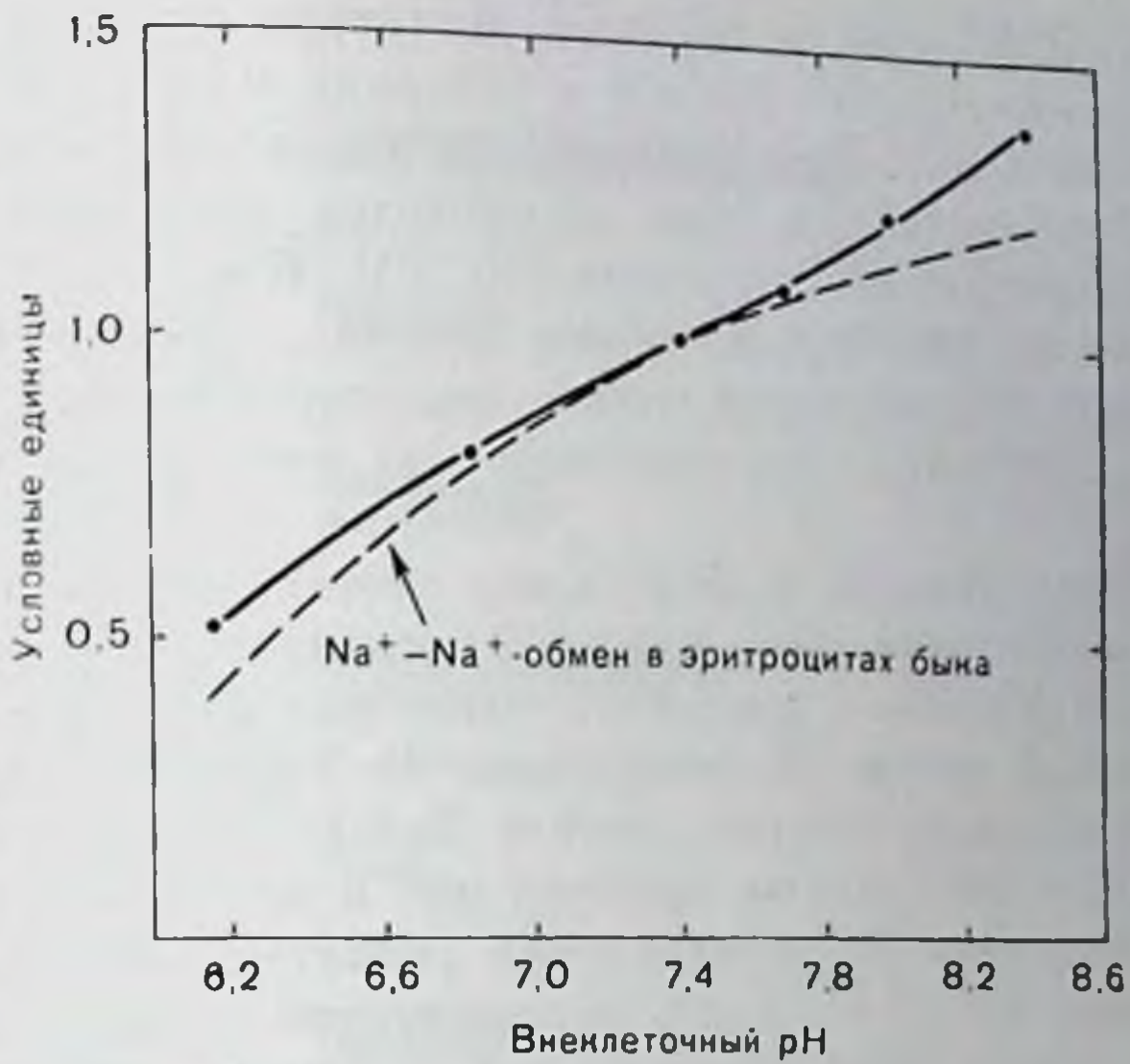


Рис. 113. Сравнение pH-зависимости  $\text{Na}^+ = \text{Li}^+$ -антипорта в эритроцитах человека и  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ -обмена в эритроцитах быка. Система  $\text{Na}^+ - \text{Li}^+$ -антипорта оценена как поглощение лития, устойчивое к действию убаина и диниридамола из холинхлоридной среды,  $2 \text{ мМ Li}^+$  напоминает  $\text{Li}^+$  на рис. 120. Кривая, обозначающая  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ -обмен, приведена по данным Motais [24].

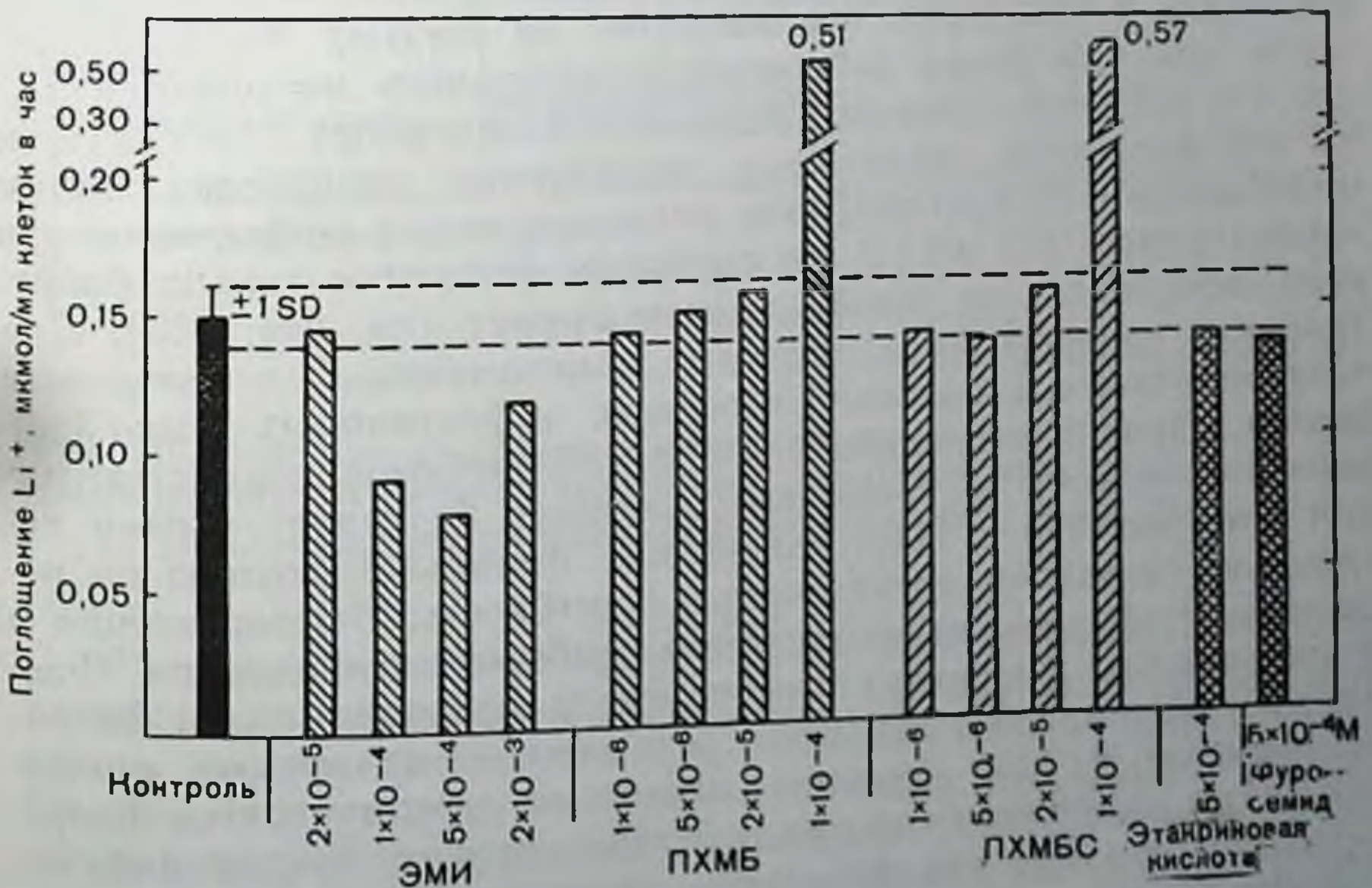


Рис. 114. Действие N-этилмалеимида (ЭМИ), п-хлормеркурийбензоата (ПХМБ), п-хлормеркурийбензосульфоната (ПХМБС), этакриповой кислоты и фуросемида на убаинустойчивое поглощение лития ( $2 \text{ мМ Li}^+$ ; дальнейшие детали эксперимента см. рис. 110). Двор Д. Б.

Действие ЭМИ как ингибитора достигало максимальных значений при концентрации 0,5 мМ в условиях нашего эксперимента при гематокрите 2%. При дальнейшем увеличении концентрации ЭМИ, ингибирующее действие маскируется вызываемым им увеличением просачивания катионов [15, 21]. ПХМБС и п-хлормеркурийбензоат не ингибируют обмен  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$ . При более высоких концентрациях SH-реагенты только индуцируют ускорение поглощения  $\text{Li}^+$  благодаря их влиянию на утечку катионов (см. рис. 114).

Этакриновая кислота и фуросемид заметно не ингибируют поглощение лития при его внешней концентрации 2 мМ (см. рис. 114, но сравнить с рис. 117). Этот факт говорит о том, что так называемый насос II, описанный Hoffman и Kregenow [20], не является промежуточным звеном  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  антипорта.

Полученные результаты привели нас к заключению, что  $\text{Na}^+$ -зависимый антипорт  $\text{Li}^+$  опосредован уабаннечувствительной системой обмена  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$ . Следовательно, уабаннечувствительная система его может быть ответственна за низкий уровень *in vivo*  $\text{Li}^+$ , встречающийся не только в эритроцитах, но и в других органах, в том числе мозге и мышцах.

#### ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ФЛОРЕТИНА НА ПОГЛОЩЕНИЕ ЛИТИЯ

На рис. 115 показаны результаты экспериментов по влиянию флоретина и некоторых его аналогов на систему  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  антипорта при измерении уабаннечувствительного поглощения  $\text{Li}^+$  при его внешней концентрации 2 мМ. Антипорт блокируется 0,2 мМ флоретина, остающееся поглощение происходит путем просачивания. Флорбензофенон несколько менее эффективен при концентрациях 0,2 мМ. В его структуре фенольное кольцо флоретина замещается на этилфенольную группу (см. рис. 115). При удалении гидроксильной группы в положении 6, в результате чего получается 2,4-диоксибензофенон, эффективность резко снижается. При концентрации 2 мМ флорбензофенон полностью ингибирует систему и, кроме того, частично блокирует утечку лития (см. рис. 115 и 117). Замещение фенольной группы на метильную уменьшает ингибиторную способность. Нафторезорцин и диоксинацетофеноны являются очень слабыми ингибиторами. Флорицинглизид флоретина, так же как и флорглюкинол и флоретиновая кислота, не эффективен. Эти данные показывают, что ингибирование  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$ -обменной системы не ограничивается флоретином, но наблюдается и при действии других соединений, содержащих две или три фенольные гидроксильные группы и гидрофобный «хвост». Остается выяснить, является ли ингибиторный эффект этих соединений результатом изменения внутримембранного потенциала, обусловленного дипольным моментом соединений [1].

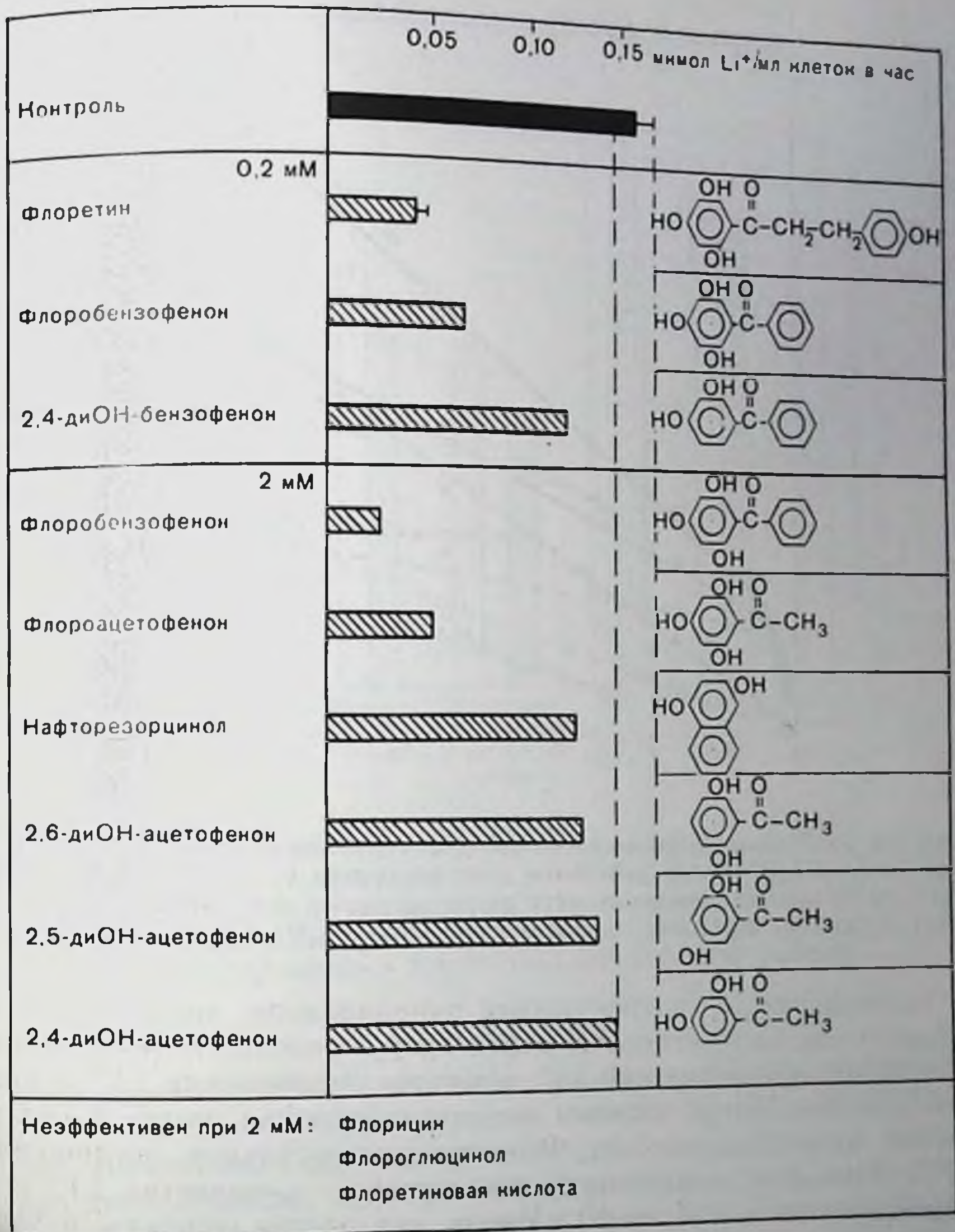


Рис. 115. Действие флоретина и некоторых его производных и аналогов на убаинустойчивое поглощение лития (холинхлоридная среда, 2 мМ  $\text{Li}_c^+$ , дальнейшие детали эксперимента см. рис. 110). Донор Дж. Д.

Флоретин и флорбензофенон, кроме блокирования системы антипорта, по-видимому, обладают вторичным ингибиторным свойством, которое проявляется при высоких концентрациях лития. На рис. 116 показана зависимость действия флоретина и дипиридамола на убаинустойчивое поглощение  $\text{Na}^+$  от внешней концентрации  $\text{Li}^+$ . Эксперименты были проведены на эритроцитах донора У. Л., у которого отмечена высокая эффективность  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$  антипорта с  $V_{\text{макс}}$  для поглощения  $\text{Li}^+$  около 3 мкМ/мл клеток в час [7, 8]. Содержание  $\text{Na}^+$  в эритроцитах достигает примерно до 9 мкМ/мл во всех опытах.

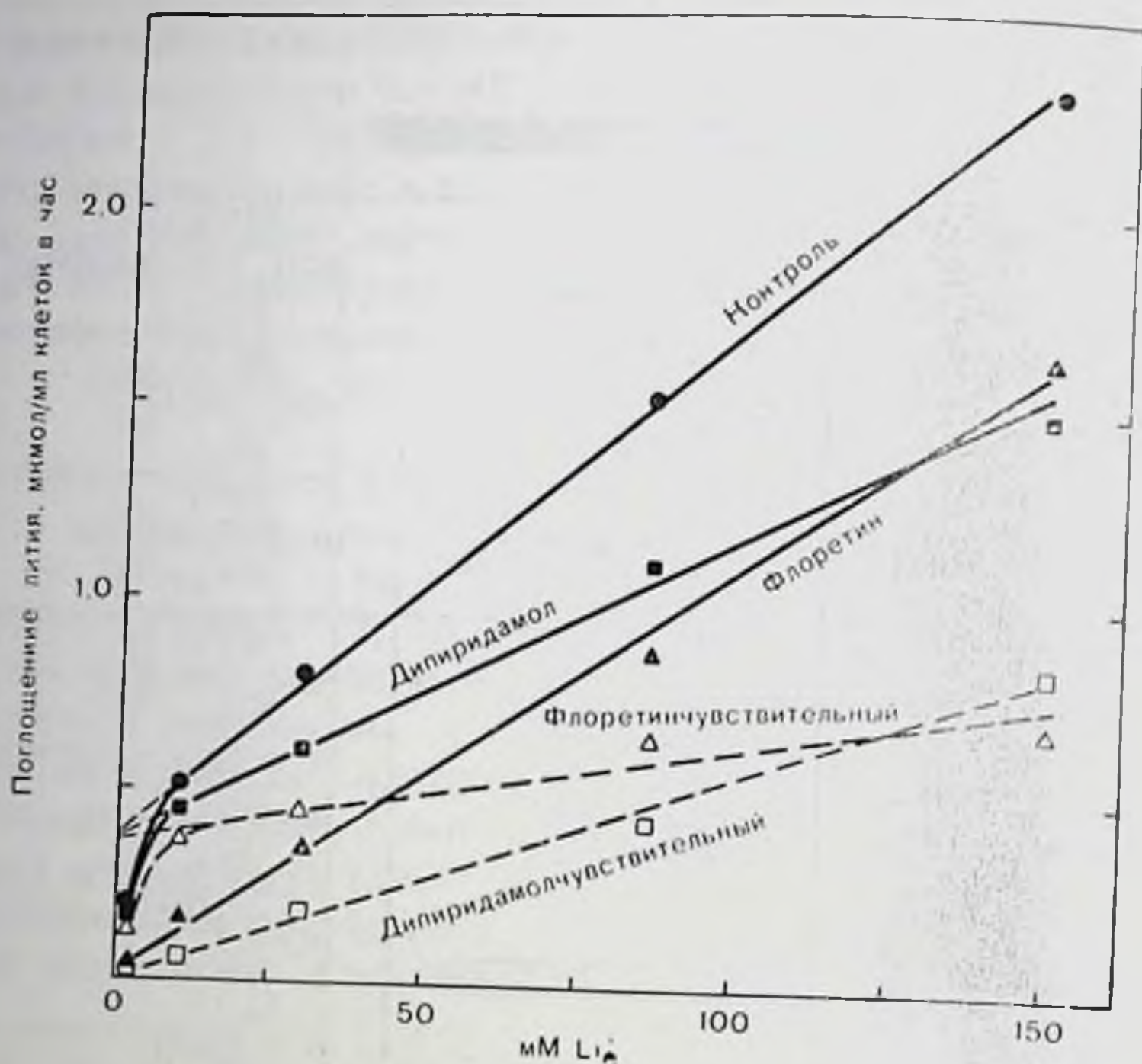


Рис. 116. Зависимость одночасового общего поглощения лития от внешней концентрации лития под действием соответственно 0,05 мМ дипиридамола и 0,2 мМ флоретина. Изотоничность поддерживали с помощью иона холина (Cl<sup>-</sup>-среда, pH 7,4, 37° С, 0,1 мМ уабанин, гематокрит 2%). Донор У. Л.

Поглощение Li<sup>+</sup> в присутствии дипиридамола, который не ингибирует систему антипорта, демонстрирует сложную зависимость от внешней концентрации Li<sup>+</sup>. Наоборот, поглощение Li<sup>+</sup> в присутствии ингибитора системы флоретина линейно растет с увеличением концентрации Li<sup>+</sup>. Флоретинчувствительное поглощение Li<sup>+</sup> значительно возрастает с увеличением количества Li<sup>+</sup> при концентрациях его ниже 10 мМоль, как можно ожидать, исходя из того, что ингибируется антипорт Li<sup>+</sup> (см. рис. 116). При концентрации наружного Li<sup>+</sup> выше 10 мМоль наблюдается дальнейшее (линейное?) увеличение флоретинчувствительного переноса Li<sup>+</sup>, которое, видимо нельзя отнести за счет ингибирования антипорта. При концентрации наружного Li<sup>+</sup> 150 мМ общее флоретинчувствительное поглощение Li<sup>+</sup> составляет около 0,7 мкмоль на 1 мл клеток в час. Эта величина вдвое превышает ту, которую можно ожидать для донора У.Л., исходя только из ингибирования системы антипорта.

Дипиридамолачувствительное поглощение Li<sup>+</sup> линейно увеличивается с повышением концентрации внешнего Li<sup>+</sup> (см. рис. 116). Следовательно, этот эффект можно отнести за счет действия дипиридамола на общее просачивание катионов Li<sup>+</sup>. Возможно, что та часть эффекта ингибирования, которая обусловлена флоретином, не является результатом его влияния на антипорт, а связана



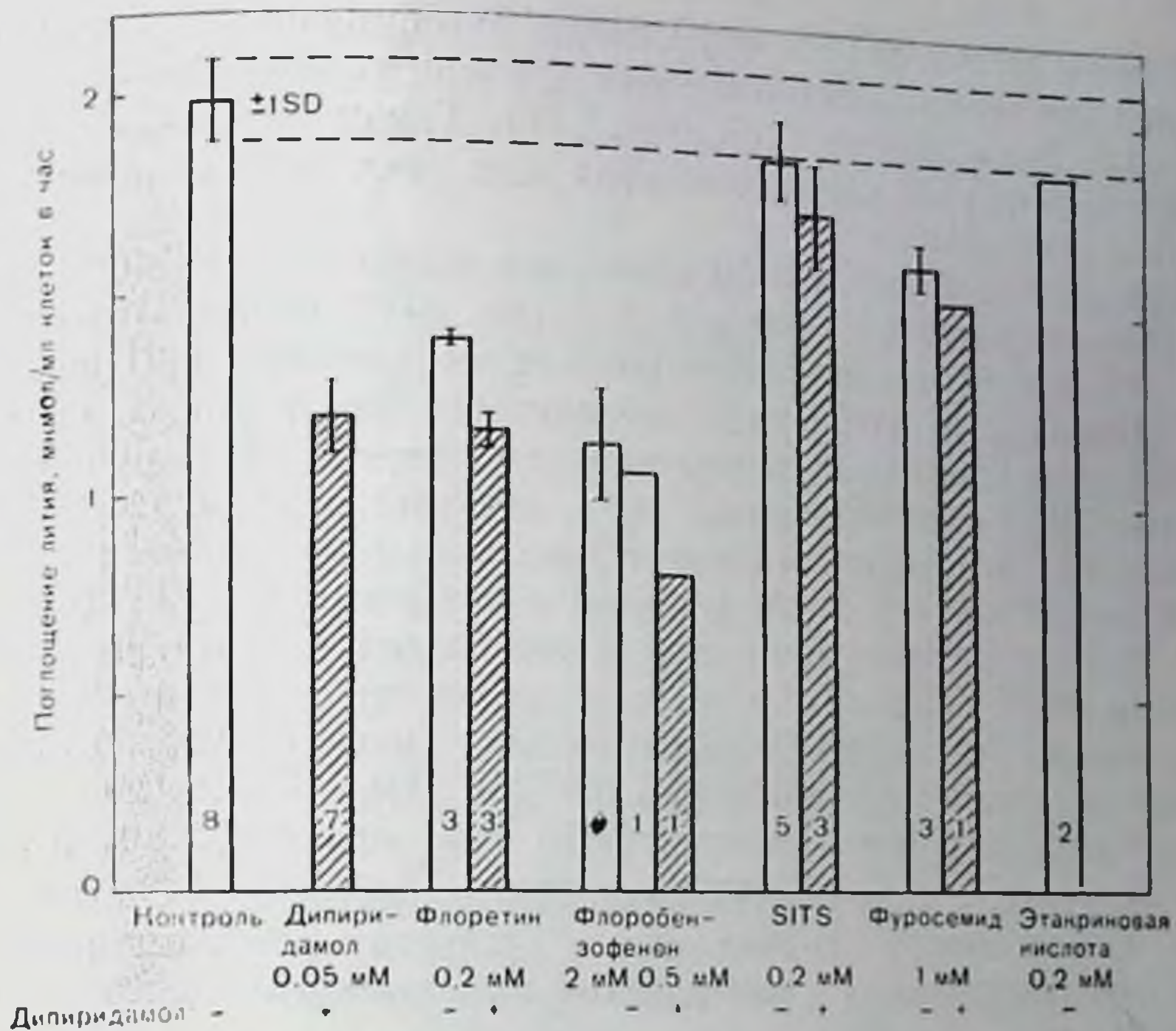


Рис. 117. Действие различных соединений на однокласовое общее поглощение лития из среды, содержащей 150 мМ LiCl (рН 7,4, 37° С, 0,1 мМ уабани, гематокрит 2%). Средние значения ( $\pm 1$  SD) из количества опытов, указанных внутри столбцов. Заштрихованные столбцы обозначают значения поглощения, полученные в присутствии 0,05 мМ дипиридамола.

с дипиридамолом подобным действием флоретина. С этим согласуется то, что линейные участки кривых, описывающих уабанистойчивое поглощение, как в отсутствие (контроль), так и в присутствии дипиридамола, и флоретин чувствительное поглощение пересекаются в одной точке на ординате (рис. 116). Величина поглощения  $\text{Li}^+$ , соответствующая этой точке, близка к ожидаемому значению 0,3 для максимального поглощения  $\text{Li}^+$  системой антипорта свежих клеток донора У. Л.

Чтобы дальше охарактеризовать вторичное действие флоретина, поглощение  $\text{Li}^+$  было изучено при его внешней концентрации 150 мМ в присутствии флоретина и дипиридамола. Как показано на рис. 117, ингибиторные свойства этих соединений только частично дополняют друг друга. Другими словами, способность каждого соединения снижается в присутствии другого. Тот же эффект наблюдался при использовании вместо флоретина флорбензофенона. Отдельные опыты показали, что действие флоретина и флорбензофенона на  $\text{Na}^+-\text{Li}^+$  антипорт не подвержено влиянию дипиридамола. Таким образом, два флорсоединения, по видимому, ингибируют систему, которая также блокируется дипиридамолом (и наоборот).

В присутствии SITS и фуросемида, ингибирующих поглощение  $\text{Li}^+$  при его внешней концентрации 150 мМ, эффективность диширидамола резко падает (см. рис. 117). Трудно сказать, есть ли общий принцип во взаимодействиях всех этих лекарственных веществ с клетками.

Небольшое, но важное ингибиторное действие SITS при внешней концентрации  $\text{Li}^+$  150 мМ (см. рис. 117) можно отнести за счет небольших количеств бикарбоната в суспензиях эритроцитов. Эти суспензии не содержали добавленного бикарбоната, но контактировали с обычной комнатной атмосферой. Бикарбонат открывает SITS-чувствительный путь, который опосредует общий перенос  $\text{Li}^+$  со скоростью около 8 нмоль на 1 мл клеток в час на 1 мМ бикарбоната и 1 мМ разницы в концентрации  $\text{Li}^+$  (см. ниже). Исходя из этого значения и наблюдаемого ингибиторного свойства SITS (около 0,1 мкМ на 1 мл клеток в час при 150 мМ  $\text{Li}^+$ ), можно установить концентрацию бикарбоната, которая в суспензиях составляет примерно 0,8 мМ. При рН 7,4 такая концентрация бикарбоната соответствует  $P_{\text{CO}_2}$  около 1,3 мм рт. ст., т. е. величине, в 6 раз превышающей это значение в чистом воздухе, но она может существовать в суспензии гликолизующих ( $\text{CO}_2$ -продуцирующих) эритроцитов при контакте с комнатной атмосферой.

Фуросемид, но не этакриновая кислота, ингибирует поглощение  $\text{Li}^+$  сильнее, чем SITS при внешней концентрации  $\text{Li}^+$  150 мМ. При низких концентрациях лития не удалось зарегистрировать значительного ингибирования фуросемидом (сравнить рис. 114 и 117). Ингибирование фуросемидом, показанное на рис. 117, может быть отнесено за счет действия фуросемида как на бикарбонатный путь, так и на фуросемидчувствительную транспортную систему.

#### СТИМУЛИРУЕМЫЙ БИКАРБОНАТОМ ТРАНСПОРТ $\text{Li}^+$

Wieth и Funder первыми продемонстрировали стимуляцию бикарбонатом пассивного движения  $\text{Li}^+$  и  $\text{Na}^+$  через мембрану эритроцитов [12—14, 34, 36]. Это действие блокируется SITS [3] — ингибитором, который считается специфичным для анионного обмена, а также диширидамолом, флорицином, флоретинном, фенобутазоном, салицилатом и фуросемидом [6, 7], являющимися ингибиторами переноса анионов через мембрану эритроцитов. Эти наблюдения укладываются в гипотезу «ионных пар», приведенную на рис. 118 [6, 34]. Гипотеза заключается в том, что двухвалентный карбонатный анион всегда присутствующий в растворах, содержащих бикарбонат, может образовывать ионную пару с  $\text{Na}^+$  и  $\text{Li}^+$ , но не с большим ионом  $\text{K}^+$ . Одновалентная отрицательная пара затем должна быстро пересекать мембрану эритроцита по пути ионного обмена, обмениваясь, например, на ион хлора или бикарбоната. Из-за того, что скорость анионного обмена во много раз превышает скорость просачивания катионов в эритроцитах, общий пере-

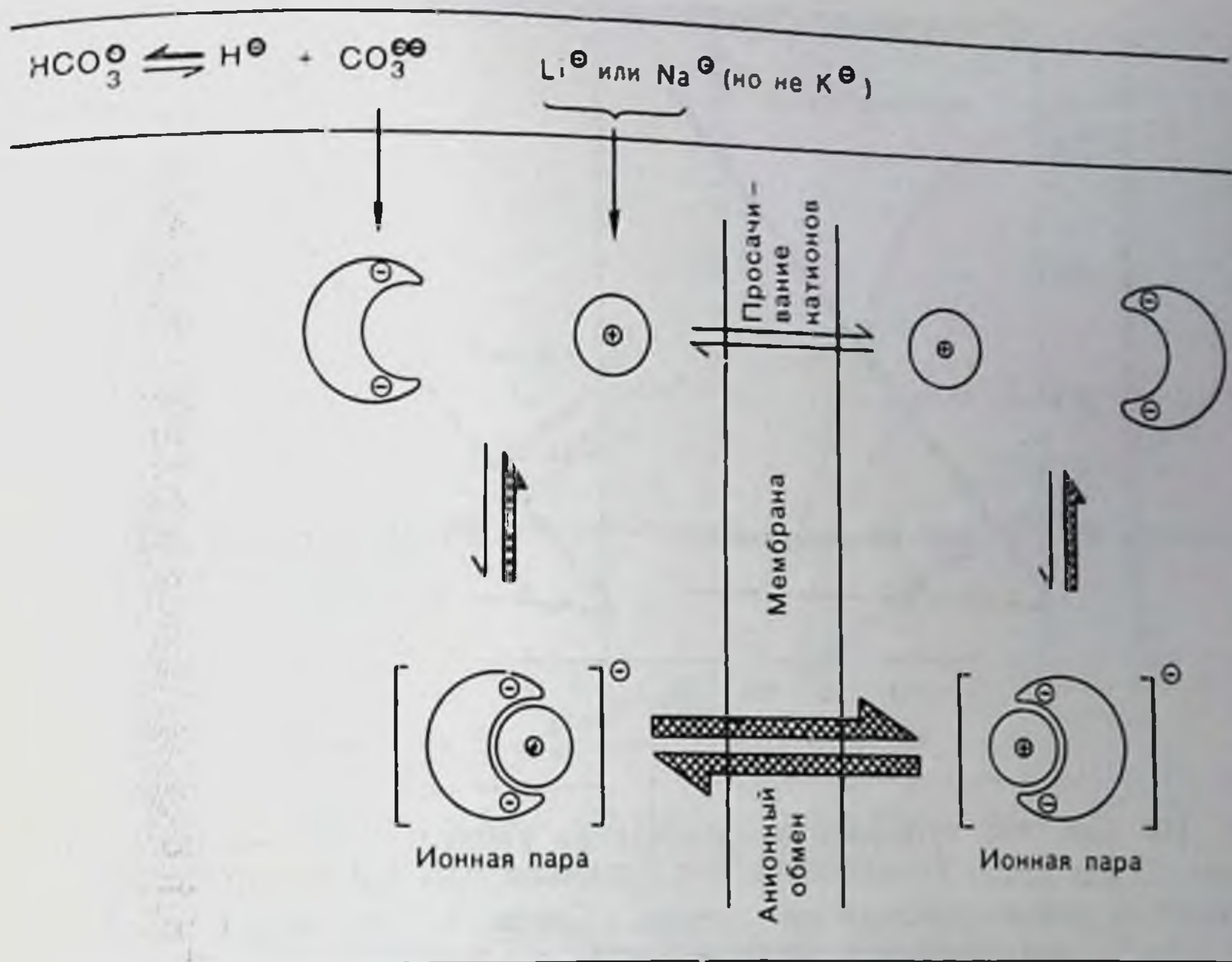


Рис. 118. Действие бикарбоната: результат ионного спаривания? Объяснение в тексте.

нос катионов должен существенно увеличиваться в присутствии бикарбоната даже при низких концентрациях карбоната и ионных пар.

Образование ионных пар должно зависеть не только от катиона, но также от природы аниона. Таким образом, нашим первым подходом к проверке гипотезы ионных пар было определение влияния органических и неорганических одно-, двух- и трехвалентных анионов с различной геометрией на общий пассивный перенос  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в эритроцитах, обработанных уабаином. Одним из главных результатов этих исследований было наблюдение, что только некоторые двухвалентные ионы, но ни один из многих изученных одно- и трехвалентных анионов, приводят к повышению пассивного переноса  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ , который чувствителен к ингибированию SITS или дишридамомом. Урамидикусная кислота — сильнейший из известных комплексов лития [32] заметно не увеличивает поглощение  $\text{Li}^+$ ; это можно приписать двухвалентной природе комплекса  $\text{Li}^+$  либо его объемной структуре. Типичные кривые, полученные с двухвалентными анионами, приведены на рис. 119. Сульфит ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) и оксалат ( $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ) являются двухвалентными анионами, у которых распределение зарядов аналогично карбонату. В присутствии неорганического или органического аниона соответственно поглощение  $\text{Li}^+$  линейно возрастает с повышением концентрации аниона. Это аналогично действию карбоната [6, 34], а также наблюдается при

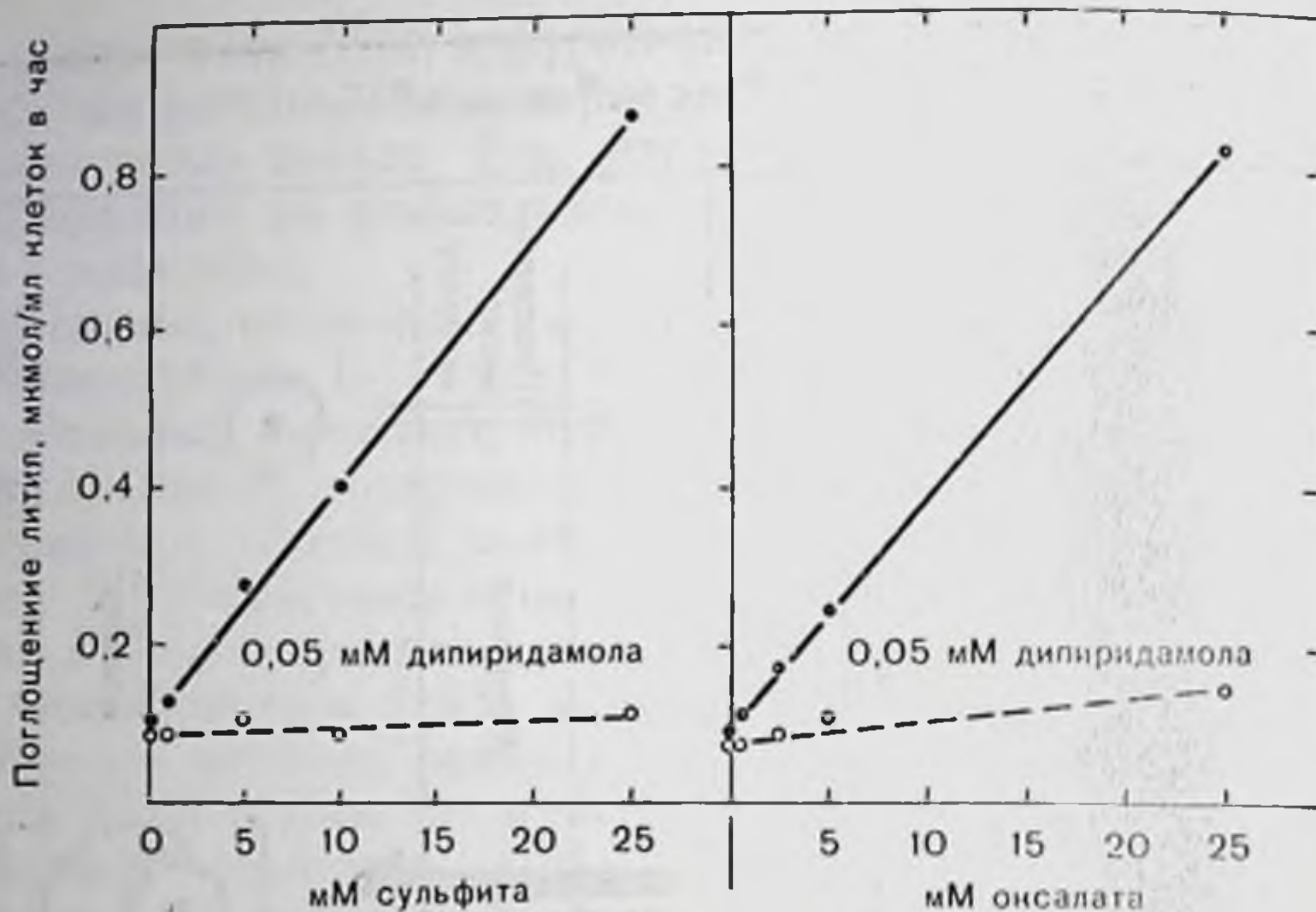


Рис. 119. Действие сульфита и оксалата на убаишустойчивое поглощение лития ( $2 \text{ мМ Li}^+$ ), находящееся под влиянием  $0,05 \text{ мМ}$  дипиридамола. Исследуемый анион заменяли на хлорид. Среда с сульфитом содержала  $100 \text{ мМ Na}^+$  изотоничность поддерживали с помощью хонина + (донор Г. Х.). Среда с оксалатом содержала  $150 \text{ мМ K}^+$  и  $10 \text{ мМ Na}^+$  (донор Р. А.). После прединкубационного периода, равного  $90 \text{ мин}$ , при  $37^\circ \text{C}$  ( $\text{pH } 7,4$ , гематокрит  $2\%$ ) поглощение лития инициировали добавлением  $\text{LiCl}$  до достижения конечной концентрации  $2 \text{ мМ}$ .

освобождения  $\text{Li}^+$ . Усиление транспорта  $\text{Li}^+$  двумя двухвалентными анионами полностью блокировалось дипиридамолом и SITS (рис. 120, см. также рис. 119).

В табл. 26 суммировано действие шести наиболее эффективных двухвалентных анионов на общий пассивный транспорт  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ . Представлены скорости дипиридамолучувствительного транспорта с поправкой на незначительное действие дипиридамола, наблюдаемое в среде с ионом  $\text{Cl}$ . Данные основаны на вычисленных концентрациях анионов при  $\text{pH } 7,4$  в среде (или при  $\text{pH } 7,2$  в лизате эритроцитов), и приведены к значениям концентраций анионов  $1 \text{ мМ}$  и градиенту концентраций переносимых катионов  $1 \text{ мМ}$ . В основном идентичные результаты были получены при замене  $0,05 \text{ мМ}$  дипиридамола на  $0,2 \text{ мМ SITS}$ .

Карбонат — наиболее сильный стимулятор пассивного движения  $\text{Li}^+$  и  $\text{Na}^+$ . Перенос  $\text{K}^+$  не усиливается карбонатом. Сульфит и оксалат менее эффективны. Действие сульфита на перенос  $\text{Na}^+$  впервые наблюдал Parker [27], который, однако, сообщил о влиянии сульфита и на перенос  $\text{K}^+$ . Это действие не подтвердилось в наших экспериментах, так как снижение количества  $\text{K}^+$  в эритроцитах, находящихся в среде, содержащей  $\text{Na}^+$  и сульфит, можно полностью объяснить эффектом разбавления в результате индуцируемого сульфитом поглощения воды наряду с  $\text{Na}^+$ . Фосфит ( $\text{HPO}_3^{2-}$ ; не путать с неактивным, потенциально трехвалентным

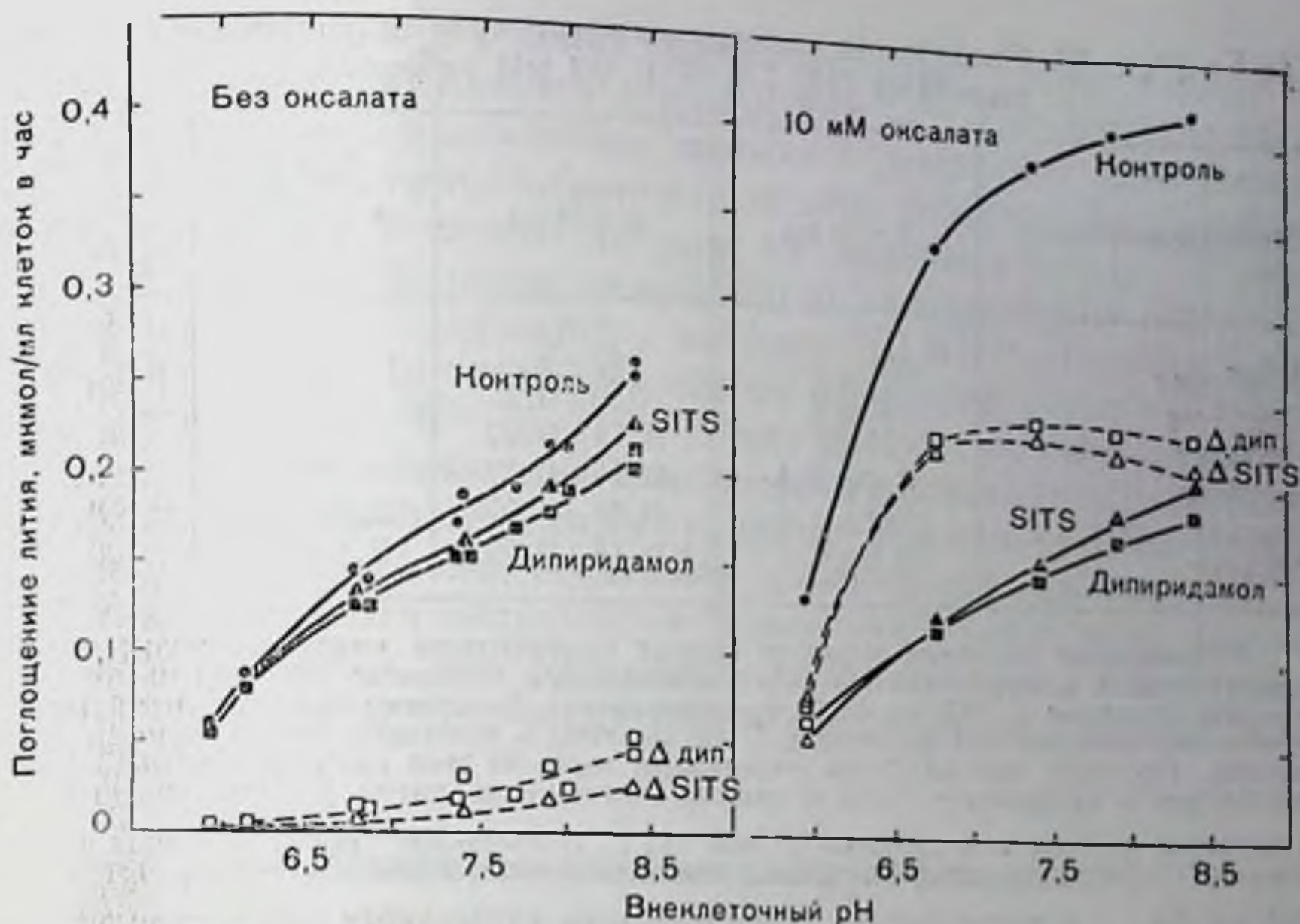


Рис. 120. pH-зависимость действия оксалата на убаивустойчивое поглощение лития, находящееся под воздействием 0,05 мМ дипиридамо́ла и 0,2 мМ SITS соответственно. Эритроциты, полученные у допора У. Л., предварительно инкубировали в течение 90 мин в среде, содержащей 150 мМ  $K^+$ , 10 мМ  $Na^+$ , основной анион — хлорид; в экспериментах, показанных справа, 20 мМ хлорида заменяли 10 мМ оксалата (37° С, pH 7,4, гематокрит 2%). После прединкубационного периода pH быстро доводили до нужного значения, добавляя 0,3 N HCl или KOH. Через 10 мин суспензию разделяли на три части: одну часть использовали как контроль, а к двум другим добавляли дипиридамо́л или SITS. Поглощение лития инициировали добавлением LiCl до конечной концентрации 2 мМ.  $\Delta$ SITS и  $\Delta$ дип. обозначает SITS- и дипиридамо́лчувствительный транспорт, т. е. разницу между общим транспортом в отсутствие и в присутствии реагентов соответственно.

фосфатом  $HPO_4^{2-}$ ) также стимулирует перенос  $Na^+$  и  $Li^+$ , но не  $K^+$ . Фталат, малеат и двухкарбоновые кислоты с большим расстоянием между зарядами, чем у оксалата, усиливают транспорт не только  $Li^+$  и  $Na^+$ , но и большого катиона  $K^+$ .

Избирательность для  $Li^+$  по сравнению с  $Na^+$  уменьшается в ряду оксалат > фосфит > сульфит > карбонат > малеат > фталат; транспорт  $Li^+$  превосходит транспорт  $Na^+$  в 79 : 26 : 6,4 : 4,4 : 3,6 : 1,4 раз.

Другим подходом для проверки гипотезы ионных пар было изучение зависимости от pH действия анионов на транспорт  $Li^+$ . Оксалат был выбран как стимулирующий анион, так как он почти полностью диссоциирует при pH выше 6 ( $pK_2 = 4,2$ ). Как видно из рис. 120, оксалат увеличивает поглощение  $Li^+$  при pH 6,0--8,5, что зависит от pH. Такое действие оксалата полностью блокируется дипиридамо́лом и SITS, которые в отсутствие оксалата обладают очень небольшой эффективностью (см. рис. 120, слева). Пунктирная кривая справа на рис. 120 показывает оксалатиндуцируе-

Таблица 26. Увеличение пассивного транспорта катионов дивалентными анионами (рН 7,4, 37° С, 0,1 мМ уабанна)\*

Дивалентный анион	Li <sup>+</sup> Ф 0,13 нм	Na <sup>+</sup> Ф 0,19 нм	K <sup>+</sup> Ф 0,26 нм	Расстояние между зарядами аниона**, нм
Карбонат	630 ± 53	143 ± 9	***	0,22
Сульфит	23 ± 2	3,6 ± 0,3	***	0,23
Оксалат	11 ± 1	0,14 ± 0,02	***	0,24
Фосфит	3,7 ± 0,4	0,14 ± 0,03	***	0,25
Фталат	1,2 ± 0,1	0,86 ± 0,07	2,4 ± 0,3	0,36
Малеат	0,5 ± 0,1	0,14 ± 0,02	0,4 ± 0,1	0,37

\* Приведены значения разницы между одночасовым «чистым» транспортом и присутствии и в отсутствие 0,05 мМ диниридамола (наномоль на 1 мл клеток в час, средние значения ± SEM из 3—15 экспериментов). Величины приведены к 1 мМ концентрации дивалентных анионов и 1 мМ разнице в концентрациях переносимых катионов. «Чистый» ток катионов определяли через 90 мин предварительного уравнивания с анионами в среде с калием. Поглощение лития устанавливали в среде с холином, калием или натрием (2 мМ Li<sup>+</sup>). Поглощение ионов натрия инициировали, суспендируя предварительно уравновешенные клетки в среде, содержащей 150 мМ Na<sup>+</sup>, и выделение K<sup>+</sup> инициировали, суспендируя предварительно уравновешенные клетки в среде с холином или натрием (в описанных средах результаты практически не различались). Концентрации анионов составляли 24—130 мМ бикарбоната (pK<sub>2</sub>=10,2; рН поддерживали около 7,4 с помощью СО<sub>2</sub>), 5—25 мМ сульфита (pK<sub>2</sub>=7,2), 5—25 мМ оксалата (pK<sub>2</sub>=4,2), по 100 мМ фосфита (pK<sub>2</sub>=6,2), фталата (pK<sub>2</sub>=5,4) и малеата (pK<sub>2</sub>=6,2).

\*\* Для дикарбоновых кислот дано минимальное расстояние с допущением, что центр заряда расположен между двумя атомами кислорода каждой карбоксильной группы.

\*\*\* Не определяется.

мый перенос, чувствительный к этим ингибиторам анионного транспорта. Характерная форма пунктирных кривых с широким интервалом между рН 7,0 и 8,5 очень напоминает рН-зависимость самообмена хлорида и йодида [16, 35]. Это сходство поддерживает гипотезу, что катионы могут пересекать клеточные мембраны в форме одновалентных, отрицательно заряженных ионных пар. Для того чтобы получить некоторые физические доказательства взаимодействия Li<sup>+</sup> и двухвалентных анионов в условиях, существующих в среде и цитоплазме, был использован метод <sup>31</sup>P ядерного магнитного резонанса. Были сняты спектры 0,1 М растворов фосфитов щелочных металлов (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Cs<sup>+</sup>) в D<sub>2</sub>O с использованием триметилфосфата [PO(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] в качестве внутреннего <sup>31</sup>P стандарта. рН растворов фосфита был близок к 10,0 для обеспечения полного депротонирования фосфитного аниона (pK<sub>2</sub>=6,2). Химические сдвиги относительно стандарта составляли +3,1, +2,3, -0,8, +6,1 Гц для солей Cs<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> соответственно. Сдвиги со знаком + соответствуют низкочастотному магнитному полю и могут указывать на ослабление электронного экранирования ядра фосфора. По абсолютной величине точность значения составляет +0,4 Гц. Это непосредственно свидетельствует о том, что распределение электронов в атоме фосфора в анионе фосфита зависит от природы соответствующего катиона. Наиболее важно, однако, по-видимому, то, что общая тенденция

химического сдвига в сторону высокочастотных полей в ряду от  $\text{Cs}^+$  к  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  нарушается в отношении  $\text{Li}^+$ ; этот катион, единственный из 4 исследованных, вызывает инверсию химического сдвига в сторону низкочастотных полей. Похожие (но намного больше) сдвиги в низкие частоты наблюдались для  $\beta$   $^{31}\text{P}$  резонанса АТФ и АДФ, когда анионы были хелатированы  $\text{Mg}^{2+}$  [28]. Таким образом, исследования методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР подтверждают точку зрения, что  $\text{Li}^+$  намного сильнее взаимодействует с анионом фосфита, чем  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (или  $\text{Cs}^+$ ); тип взаимодействия, вероятно, аналогичен взаимодействию комплекса двухвалентных катионов с отрицательными фосфатными группами. Поскольку ЯМР-сдвиги, вызванные 4 катионами, выражены в относительных единицах и, возможно, являются результатом более чем одного типа взаимодействий, тот факт, что  $\text{Na}^+$  вызывает наименьший химический сдвиг, не означает, что между ним и фосфитом отсутствует взаимодействие.

### Интерпретация анионных эффектов

Если все данные, приведенные в табл. 26 и на рис. 119 и 120, являются результатом проникновения ионных пар по пути анионного обмена (независимо от того, образуются эти пары в водной фазе или в гидрофобном окружении мембраны), можно предположить, что ионные пары существуют в течение достаточно длительного времени, чтобы иметь возможность пересечь мембрану и что для них доступен путь анионного обмена. Хотя роль этих факторов в общем эффекте неизвестна, наблюдаемый порядок эффективности и селективности анионов качественно совпадает с ионным спариванием, которого можно ожидать на основе электростатических взаимодействий.

### Избирательность

Диаметр негидратированных катионов увеличивается в порядке  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$  (см. табл. 26), плотность заряда — в обратном направлении. Соответственно, если для катион-анионного взаимодействия не требуется полного снятия гидратных оболочек (что легко можно предположить), то выигрыш энергии при образовании пары с анионом будет больше для  $\text{Li}^+$ , чем для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  [11]. Преимущество при образовании пар для  $\text{Li}^+$ , действительно, наблюдается при использовании карбоната, сульфита, оксалата и фосфита. Однако, что касается фталата и малеата (см. табл. 26), происходит инверсия этого ряда. Относительно большое расстояние между зарядами (и гибкость структуры) этих двух анионов очевидно, приводит к возможности эффективного взаимодействия с большим катионом  $\text{K}^+$ , которое невозможно для меньших анионов. Расстояние между зарядами в двухвалентных анионах может в связи с этим являться главным критерием катион-анионной избирательности. Может иметь значение и стерическая «адаптация».

которая уже подразумевалась в отношении фталата и малеата. Еще одним примером может служить высокая избирательность оксалата к  $\text{Li}^+$  по сравнению с  $\text{Na}^+$ . Карбоксильные группы оксалата могут вращаться вокруг углерод-углеродной оси и в свободном состоянии для аниона можно предположить конфигурацию, при которой разделение зарядов максимально и стерические затруднения между карбоксильными группами минимальны. При связывании с  $\text{Li}^+$  и  $\text{Na}^+$  (или  $\text{K}^+$ ) это основное состояние аниона оксалата, вероятно, должно изменяться. Разница в энергии, необходимой для таких конформационных изменений, сопровождающих связывание катионов, частично объясняет наблюдаемый ряд избирательности катионов. Подобные эффекты слабее выражены для более жестких анионов — карбоната, сульфита, фосфита, что соответствует их более низкой  $\text{Li}^+$ - $\text{Na}^+$  избирательности.

### *Эффективность*

В общем эффективность изученных анионов в отношении переноса какого-то определенного катиона снижается с увеличением расстояния между зарядами аниона. И вновь исключение представляет ион фталата (см. табл. 26). Действие на перенос  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  исчезает, когда расстояние между зарядами становится больше 0,5 нм (как в отношении изофталата, фурмарата, ацетиленидикарбоксилата; результаты не приведены). Это может происходить по той причине, что одновременное взаимодействие катионов с двумя зарядами аниона уже невозможно.

Приведенные возможные объяснения различного действия анионов несомненно упрощены [11, 31]. Природа полных связей остается неустановленной, так же как и относительная роль стабильности ионных пар, плотности заряда анионных групп и катионных партнеров, расстояния между зарядами у анионов и энергии, необходимой для конформационных изменений и дегидратации.

### **Возможное физиологическое значение действия бикарбоната**

Все приведенные данные, вероятнее всего, подтверждают гипотезу, сущность которой состоит в том, что катионы щелочных металлов могут проходить через мембрану эритроцитов в виде одновалентных, отрицательно заряженных ионных пар. Это свойство присуще не только эритроцитам, так как и в других тканях и органах транспорт анионов обладает свойствами, аналогичными анионному обмену в эритроцитах человека.

Однако общее физиологическое значение трансмембранного переноса ионных пар еще предстоит изучить. Можно полагать, что изменения концентрации внеклеточного бикарбоната вызывают изменения содержания клеточного  $\text{Na}^+$  (и содержания клеточного  $\text{Li}^+$  у больных, получавших этот элемент) не только в эритроцитах [7, 13], но и в других тканях. Кроме того, ионная па-



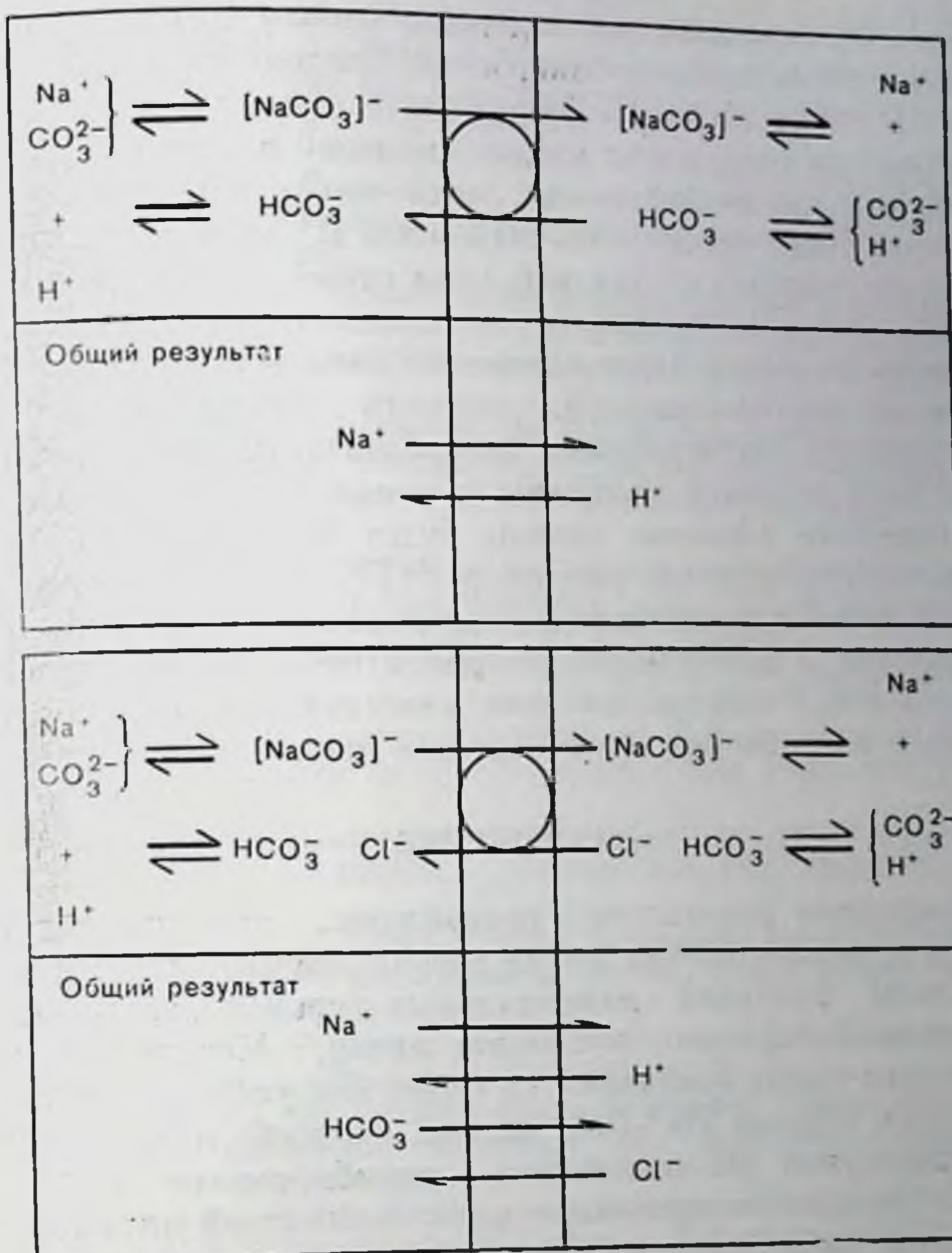


Рис. 121. Обмен  $\text{Na}^+$ -карбонатных ионных пар с бикарбонатом (вверху) или хлоридом (внизу). Общим результатом будет  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -обмен или одновременный обмен  $\text{Na}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$  на  $\text{H}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . Объяснения в тексте.

ра  $\text{Na}^+$  — карбонат может быть включена в  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  антипорт, в выделение  $\text{H}^+$  и в перенос хлорида и бикарбоната. Эти пути показаны на рис. 121. Если ионная пара  $\text{Na}^+$  — карбонат обменивается с бикарбонатом, то конечным результатом будет обмен  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$ , «носителем» будет карбонат (рис. 121, вверху). Когда ионная пара обменивается с хлоридом, ситуация усложняется, конечным результатом становится обмен  $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$  на  $\text{HCl}$  (или, другими словами, одновременный обмен  $\text{Na}^+$  на  $\text{H}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$  на  $\text{Cl}^-$ ) (рис. 121, внизу). Обмен  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  является результатом следующих стадий: на одной стороне мембраны (рис. 121, внизу слева) бикарбонат используется для образования карбоната, который переносится через мембрану в виде пары с  $\text{Na}^+$  в обмен на ион хлорида. После стадии переноса пара распадается, в результате чего образуются карбонат и  $\text{Na}^+$ . Регенерированный таким обра-

зом карбонат связывает ион водорода, чтобы при физиологических значениях рН образовать бикарбонат. Следовательно, кроме обмена  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ , одна молекула бикарбоната обменивается на хлорид. Независимо от того, какая из двух моделей действия системы будет выбрана для рассмотрения, этот тип вторичного активного транспорта будет продолжать вытеснять  $\text{H}^+$  из клеток при физиологических условиях до тех пор, пока существует градиент  $\text{Na}^+$  — карбонат.

Система не будет непосредственно зависеть от реакций, катализируемых карбоангидразой, скорость обмена будет регулироваться только концентрациями бикарбоната, карбоната, хлорида и  $\text{Na}^+$  на двух сторонах мембраны и, конечно, активностью обменного механизма. Система, однако, будет блокироваться ингибиторами анионного обмена, например SITS. Здесь стоит отметить, что SITS, как было показано в последнее время, блокирует секрецию протонов и реабсорбцию натрия в проксимальных почечных канальцах [33]. Остается неясным, участвуют ли ионные пары сами по себе в описанных транспортных процессах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные результаты показывают, что индивидуальные различия и распределения лития между эритроцитами и плазмой обусловлены разницей максимальных транспортных емкостей  $\text{Na}^+$ -зависимой системы антипорта лития. Некоторые свойства этой системы также совпадают со свойством убаиннечувствительной системы обмена  $\text{Na}^+-\text{Na}^+$ : низкое сродство к внешнему натрию, характерная рН-зависимость, ингибирование ЭМИ, но не ПХМБС. Сделано заключение, что  $\text{Na}^+$ -зависимый антипорт лития опосредован убаиннечувствительной системой обмена  $\text{Na}^+-\text{Na}^+$ .

Флоретин и некоторые его структурные аналоги (флорбензофенон, 2,4-диоксибензофенон, флорацетофенон) ингибируют  $\text{Na}^+$ -зависимый антипорт лития. Кроме того, этот класс соединений обладает вторичным ингибиторным свойством, которое относят за счет сходного с дипиридамолом действия на просачивание лития.

Карбонат, сульфит, оксалат и фосфит стимулируют пассивный перенос лития и натрия, но не калия. Фталат и малеат усиливают также транспорт  $\text{K}^+$ . Эти эффекты блокируются SITS и дипиридамолом и приписываются прохождению ионных пар по пути анионного обмена. Предполагают, что перенос ионной пары  $\text{Na}^+$  — карбонат по пути анионного обмена может быть включен в  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  антипорт,  $\text{H}^+$ -секрецию и в трансмембранный транспорт хлорида и бикарбоната.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen O. S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membrane. — J. Gen. Physiol., 1976, 67, 749—771.
2. Brading A. F. Sodium/sodium exchange in the smooth muscle of the guinea pig taenia coli. — J. Physiol., 1975, 251, 79—105.

3. Callahan T. J., Goldstein D. A. Selective passive cation transport in the human red cell membrane. — Fed. Proc., 1972, 31, 845 Abst.
4. Dorus E., Pandey G. N., Davis J. M. Genetic determinant of lithium ion distribution. An in vitro and in vivo monozygotic-dizygotic twin study. — Arch. Gen. Psychiatr., 1975, 32, 1097—1102.
5. Duhm J., Eisenried F., Becker B. F., Greil W. Studies on the lithium transport across the red cell membrane. I.  $\text{Li}^+$  uphill transport by the  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{Li}^+$  countertransport system of human erythrocytes. — Pflug. Arch., 1976, 364, 147—155.
6. Duhm J., Becker B. F. Studies on the lithium transport across the red cell membrane. II. Characterization of ouabain-sensitive and ouabain-insensitive  $\text{Li}^+$  transport. Effects of bicarbonate and dipyridamole. — Pflug. Arch., 1977, 367, 211—219.
7. Duhm J., Becker B. F. Studies on the lithium transport across the red cell membrane. III. Factors contributing to intraindividual variability of  $\text{Li}^+$  distribution across the human red cell membrane. — Pflug. Arch., 1977, 368, 203—208.
8. Duhm J., Becker B. F. Studies on the lithium transport across the red cell membrane. IV. Interindividual variations in the  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{Li}^+$  countertransport system. — Pflug. Arch., 1977, 370, 211—219.
9. Dunham P. B., Senyk O. Lithium efflux through the Na — K pump in human erythrocytes. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 3099—3103.
10. Elizur A., Shopsin B., Gershon S., Ehlenberger A. Intra: extracellular lithium ratios and clinical course in affective states. — Clin. Pharmacol. Ther., 1972, 13, 947—952.
11. Eisenman G. The molecular basis for ion selectivity and its possible bearing on the neurobiology of lithium. — Neurosci. Res. Prog. Bull., 1976, 14, 154—161.
12. Funder J., Wieth J. O. Effect of some monovalent anions on fluxes of Na and K, and on glucose metabolism of ouabain treated human red cells. — Acta Physiol. Scand., 1967, 71, 168—185.
13. Funder J., Wieth J. O. Human red cell sodium and potassium in metabolic alkalosis. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1974, 34, 49—59.
14. Funder J., Wieth J. O. Combined effects of digitalis therapy and of plasma bicarbonate on human red cell sodium and potassium. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1974, 34, 153—160.
15. Giebel O., Passow H. Die Wirkung von N-Äthylmaleimid auf die Kationenpermeabilität von Menschen-Erythrocyten. — Naturwissenschaften, 1961, 48, 721.
16. Gunn R. B. A titrable carrier for monovalent and divalent inorganic anions in red blood cells.—In: Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes. Recent Advances in Membrane and Metabolic Research, ed. by E. Gerlach, K. Mosser, E. Deutsch, W. Wilmans, 1973, p. 77—79. Georg Thiem, Stuttgart.
17. Greil W., Eisenried F., Becker B. F., Duhm J. Interindividual differences of the  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{Li}^+$  treated patients. — Psychopharmacology, 1977, 53, 19—26.
18. Greil W., Schnell K., Seibold S. Intra/extra-zelluläres Lithiumverhältnis. Klinische and experimentelle Befunde an Thrombocyten und Erythrocyten. — Arzneim. Forsch. (Drug. Res.), 1974, 24, 1079—1084.
19. Haas M., Schooler J., Tosteson D. C. Coupling of lithium to sodium transport in human red cells. — Nature, 1975, 258, 425—427.
20. Hoffman J. F., Kregenow F. M. The characterization of new energy dependent cation transport processes in red blood cells. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966, 137, 566—576.
21. Jacobs H. S., Jandl J. H. Effects of sulfhydryl inhibition on red cell hemolysis. I. Mechanism of hemolysis. — J. Clin. Invest., 1962, 41, 779—792.
22. Mendels J., Frazer A. Intracellular lithium concentration and clinical response. Towards a membrane theory of depression. — J. Psychiatr. Res., 1973, 10, 9—18.
23. Mills B., Tupper J. T. Cation permeability and ouabain-insensitive cation flux in the Ehrlich ascites tumor cell. — J. Membr. Biol., 1975, 20, 75—97.

24. *Motais R.* Sodium movements in high-sodium beef red cells: Properties of an ouabain-insensitive exchange diffusion. — *J. Physiol.*, 1973, 233, 395—422.
25. *Motais R., Sola F.* Characteristics of a sulphhydryl group essential for sodium exchange diffusion in beef erythrocytes. — *J. Physiol.*, 1973, 233, 423—438.
26. *Pandey G. N., Javaid J. I., Davis J. M., Tosteson D. C.* Mechanism of lithium transport in red blood cells. — *Physiologist*, 1976, 19, 321 (abstract).
27. *Parker J. C.* Influence of 2,3-diphosphoglycerate metabolism on sodium-potassium permeability in human red blood cells: Studies with bisulfite and other redox agents. — *J. Clin. Invest.*, 1969, 48, 117—125.
28. *Rao B. D. N., Cohn M.*  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance of bound substrates of arginine kinase reaction. — *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 3344—3350.
29. *Rybakowski J., Frazer A., Mendels J., Ramsey T. A.* Prediction of lithium ratio in man by means of an in vitro test. — *Clin. Pharm. Therap.*, 1977, 22, 465—469.
30. *Sachs J. R.* Ouabain-insensitive sodium movements in the human red blood cell. — *J. Gen. Physiol.*, 1971, 57, 259—282.
31. *Saenger W., Reddy B. S., Muhlegger M., Weimann G.* X-ray study of the lithium complex of  $\text{NAD}^+$ . — *Nature*, 1977, 267, 225.
32. *da Silva J. J. R. F., Williams R. J. P.* Possible mechanism for the biological action of lithium. — *Nature*, 1976, 263, 237—239.
33. *Ulrich K. J., Capso G., Rumrich G., Papavassilion F., Kloss S.* Coupling between proximal tubular transport processes. Studies with ouabain, SITS, and  $\text{HCO}_3^-$ -free solutions. — *Pflug. Arch.*, 1977, 368, 245—252.
34. *Wieth J. O.* Effects of bicarbonate and thiocyanate on fluxes of Na and K, and on glucose metabolism of actively transporting human red cells. — *Acta Physiol. Scand.*, 1969, 75, 313—329.
35. *Wieth J. O., Dalmark M., Gunn R. B., Tosteson D. C.* The transfer of monovalent inorganic anions through the red cell membrane. — In: *Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes. Recent Advances in Membrane and Metabolic Research*, ed. by E. Gerlach, K. Moser, E. Deutsch, W. Wilmans, 1973, p. 71—76. Georg Thieme, Stuttgart.
36. *Wieth J. O., Funder J.* An effect of anions on transfer of sodium through the human red cell membrane. — *Scand. J. Clin. Invest.*, 1965, 17, 399—400.

### ДЕЙСТВИЕ ФУРОСЕМИДА НА НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ К УАБАИНУ ТОК $\text{K}^+$ И $\text{Cl}^-$ В КЛЕТКАХ ЭРЛИХА

ПЕТЕР ГЕК, ЭРИХ НЕЙН, КРИСТИАН ПЕТРЖИК, БАРБАРА ПФЕЙФФЕР  
(PETER GECK, ERICH HEINZ, CHRISTIAN PIETRZYK,  
BARBARA PFEIFFER)

*Отделение физической биохимии, Центр биологической химии  
Густава Эмбдена, Университета имени И. В. Гете, 6000  
Франкфурт-на-Майне, 70, ФРГ*

«Градиентная» гипотеза [1], согласно которой активный транспорт аминокислот в клетки Эрлиха приводится в движение электрохимическим потенциалом ионов натрия, до сих пор вызывает дискуссии. Главное противоречие усматривается в том, что даже при инвертированных градиентах  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  аминокислоты могут активно переноситься в клетки [9]. Однако согласно более новым данным, это видимое противоречие исчезает, если принять во внимание, что электрогенный  $\text{Na}^+$ -насос, который, продуцируя электрическую разность потенциалов, поддерживает правильное

направление разности электрических потенциалов ионов  $\text{Na}^+$  обеспечивает транспорт аминокислот, несмотря на обратный градиент концентрации [5, 6]. Это свойство электрогенного натриевого насоса особенно сильно проявляется в клетках с дефицитом  $\text{K}^+$  и он может быть активирован внеклеточным  $\text{K}^+$  и ингибироваться убаином. Таким образом, повышение концентрации внеклеточного кальция сильно увеличивает вытеснение избыточного  $\text{Na}^+$  и одновременно электрический потенциал мембраны, что было показано как на распределении липофильных катионов, так и по гашению флюоресценции чувствительных к потенциалу цианидных красителей, и поэтому стимулирует приток аминокислот [2, 7]. При постоянной концентрации внеклеточного  $\text{Na}^+$  избыточное поглощение аминокислот прямо зависит от электрического потенциала [7]. И, наоборот, электрический потенциал можно до некоторой степени нейтрализовать, увеличивая концентрацию аминокислот, так как нагруженные аминокислоты служат ионофорами [3]. Действие электрогенного насоса блокируется убаином.

В то время как все эти наблюдения, по-видимому, свидетельствуют в пользу электрогенного насоса, поведение ионов  $\text{Cl}^-$  не согласуется с этой гипотезой. Поэтому распределение ионов  $\text{Cl}^-$ , как было показано, не следует за упомянутыми изменениями электрического потенциала. Сначала полагали, что ионы хлора проходят через мембрану слишком медленно, чтобы можно было зафиксировать изменения потенциала. Было показано, что поглощение хлорида большей частью идет по пути быстрого обмена  $\text{Cl}^- - \text{OH}^-$ , тогда как суммарное движение хлорида может быть медленным. Учитывая быстрый обмен  $\text{Cl}^- - \text{OH}^-$ , можно ожидать, что распределение ионов  $\text{Cl}^-$  контролируется в первую очередь разницей рН, а не электрических потенциалов. Однако это будет тормозить только установление конечного равновесия между распределением хлорида и электрическим потенциалом. Наоборот, хлорид даже не обладает тенденцией к достижению равновесия с потенциалом: иногда он движется в клетку, когда электрический потенциал еще остается сильно положительным снаружи, что сопровождается почти стехиометрическим количеством ионов  $\text{K}^+$ . Этот «парадоксальный» приток кальция, видимо, не чувствителен к убаину, но чувствителен к ингибиторам метаболизма. Раньше мы думали, что это парадоксальное поглощение  $\text{KCl}$  объясняется действием  $\text{K}^+$ -активируемого насоса протонов, который, вытесняя ионы  $\text{H}^+$  в обмен на  $\text{K}^+$ , будет увеличивать концентрацию клеточного  $\text{OH}^-$  и, таким образом, вызывать поглощение хлорида через быстрый обмен  $\text{Cl}^- - \text{OH}^-$  [8]. В результате наблюдается общее поглощение  $\text{KCl}$  с одновременным выделением эквивалентного количества воды.

Можно действительно показать, что в аэробных условиях клетки Эрлиха выделяют протоны в окружающую среду, но их движение не зависит от внеклеточного  $\text{K}^+$ . Однако так как скорость выделенных протонов ограничена скоростью удаления  $\text{OH}^-$ , она может представлять скорее скорость генерации ионов  $\text{H}^+$ , чем ско-

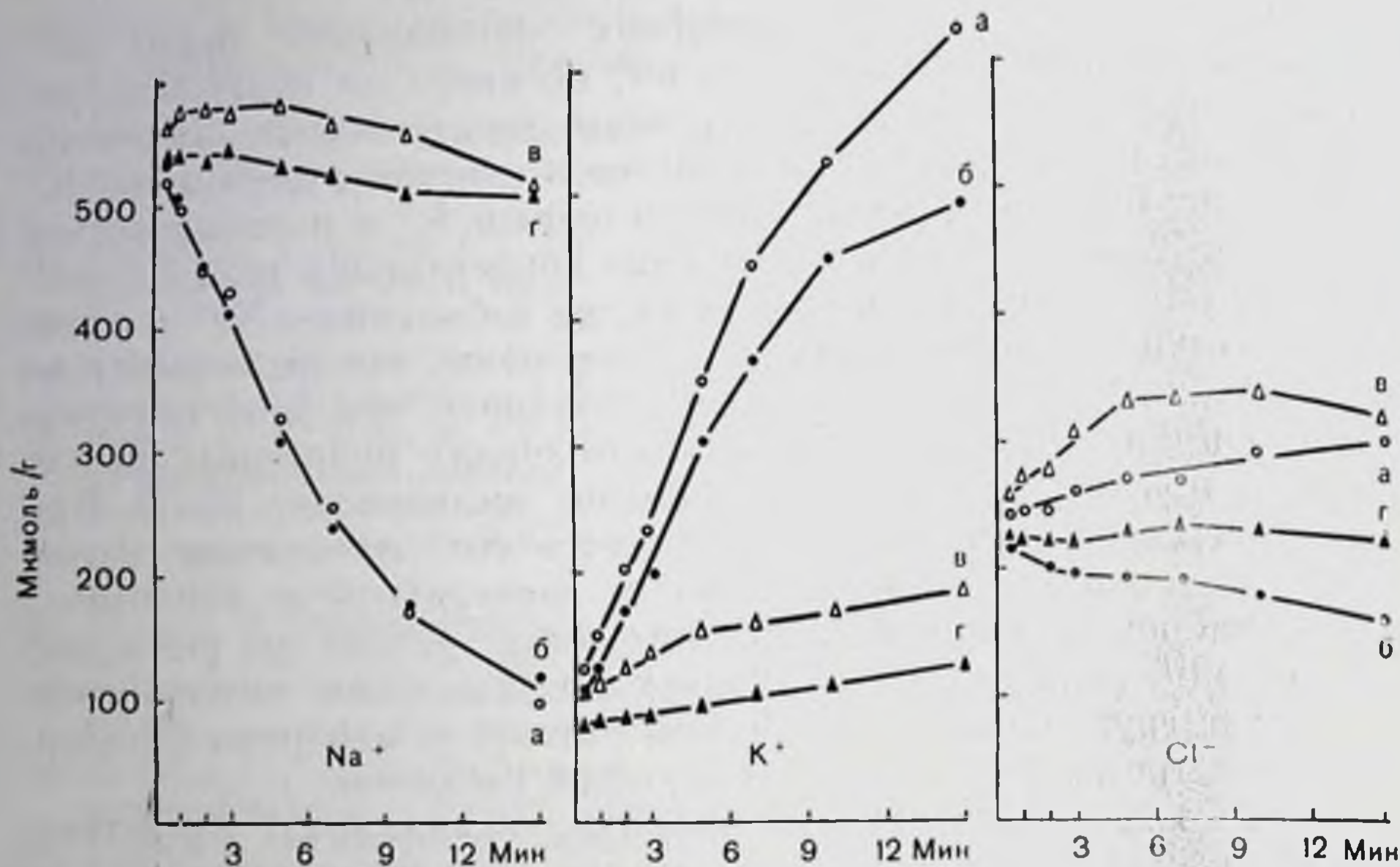


Рис. 122. Действие фуросемида и убаина на ионный транспорт. Содержание натрия, калия и хлора (мкмоль/г) в клетке представлено как функция времени инкубации в присутствии и в отсутствие 2 мМ фуросемида и 1 мМ убаина.

а — контроль, б — фуросемид, в — убаин, г — фуросемид и убаин. К клеткам с недостатком  $K^+$  в бескальевой среде добавляли буфер, содержащий 15 мМ калия с или без фуросемида (2 мМ) и убаина (1 мМ). Слева на рисунке показано, что вытеснение натрия при добавлении фуросемида существенно не меняется. Однако присутствие убаина блокирует вытеснение натрия независимо от присутствия фуросемида. В средней части рисунка можно видеть, что добавление  $K^+$  приводит к быстрому поглощению ионов  $K^+$ , которое в значительной степени ингибируется 2 мМ фуросемида; 1 мМ убаина уменьшает поглощение калия значительно, но не полностью. Остаточное убаинустойчивое поглощение  $K^+$ , по-видимому, сильно ингибируется фуросемидом. В правой части рисунка показано, что убаиннечувствительное поглощение  $K^+$  связано с поглощением  $Cl^-$ , которое может быть заблокировано фуросемидом. В контрольной пробе в отличие от образцов, ингибированных убаином, действие электрогенного насоса приводит к вытеканию хлорида. Клетки с добавлением одного фуросемида демонстрируют такое же вытекание, как и клетки, к которым добавлены оба ингибитора. Во всех экспериментах был использован буфер Кребса—Рингера (фосфатный), содержащий 1% альбумина (153 мМ  $Na^+$  и  $K^+$ , 1,9 мМ  $Ca^{2+}$ , 1,3 мМ  $Mg^{2+}$ , 138 мМ  $Cl^-$ , 1,3 мМ  $SO_4^{2-}$ , 10 мМ неорганического фосфата; pH 7,4; инкубация при 37 °C).

рость их транспорта. Поэтому мы попытались изучить вытеснение  $H^+$  за короткие интервалы времени, но ни быстрое увеличение внеклеточного  $K^+$ , ни быстрый ввод кислорода в анаэробную клеточную систему в присутствии  $K^+$  не может вызвать быстрое выделение ионов  $H^+$ . Остается еще возможность, что ионы  $H^+$  выделяются не прямо на внешнюю поверхность, но сначала в некоторый промежуточный внутриклеточный компартмент, с которого они могут просачиваться в окружающую среду. С другой стороны, ионы  $OH^-$ , сконцентрированные внутри клетки, могут быстро обмениваться на ионы  $Cl^-$  через наружные клеточные мембраны. Существование таких внутриклеточных кислых компартментов, видимо, предполагалось, исходя из различного распределения основных и кислых pH зондов, таких, как метиламин и

Рис. 123. Действие убаина и фуросемида на  $^{42}\text{K}^+$ -поглощение в стационарном состоянии. Относительное поглощение  $\text{K}^+$  (мл/г) представлено в зависимости от времени инкубации. Перед добавлением  $^{42}\text{K}^+$ , убаина (1 мМ), фуросемида (2 мМ) и обоих ингибиторов клетки уравнивали в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$  в фосфатном буфере Кребса—Рингера при pH 7,4, содержащем 1% альбумин и 9 мМ  $\text{K}^+$ .

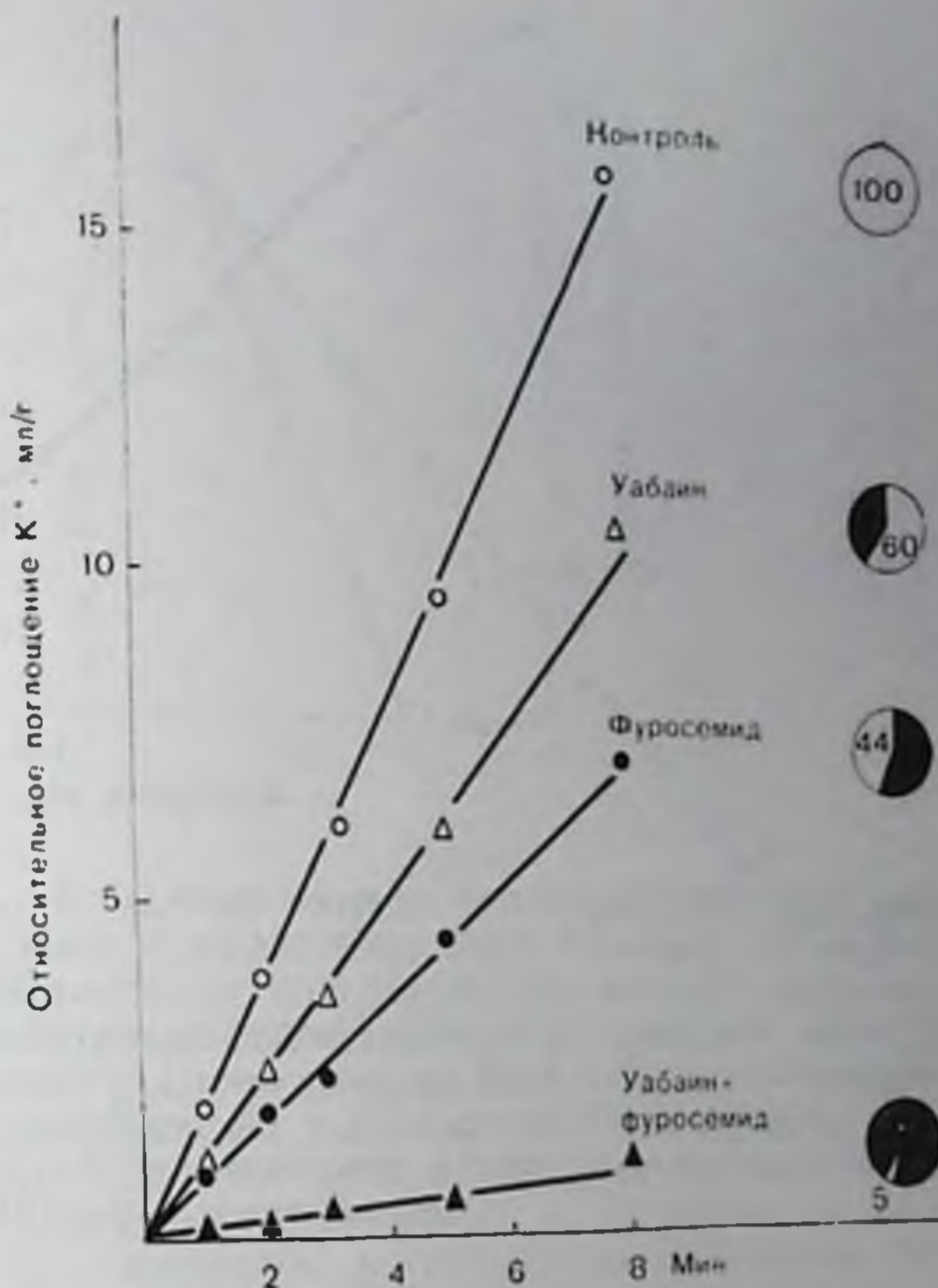
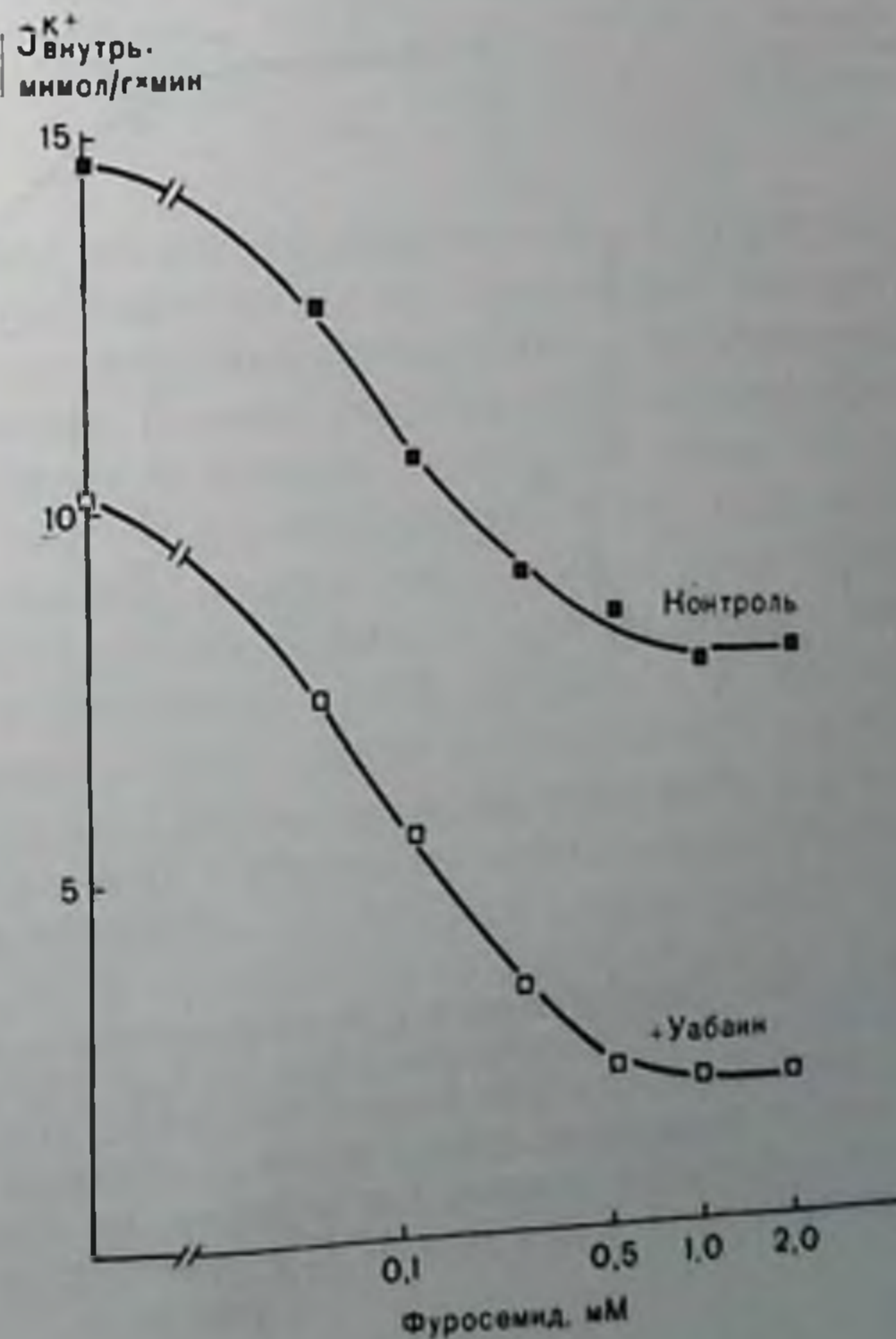


Рис. 124. Ингибирование  $^{42}\text{K}^+$ -притока фуросемидом в стационарном состоянии. Поглощение  $^{42}\text{K}^+$  (мкмоль/г · мин) в присутствии и в отсутствие убаина (1 мМ) представлено как функция концентрации фуросемида. Перед инкубацией клеток в течение 5 мин при  $37^\circ\text{C}$  с  $^{42}\text{K}^+$  и различными количествами фуросемида с или без убаина (1 мМ) их уравнивали в течение 30 мин в фосфатном буфере Кребса—Рингера (pH 7,4, 1% альбумин, 9 мМ  $\text{K}^+$ ).



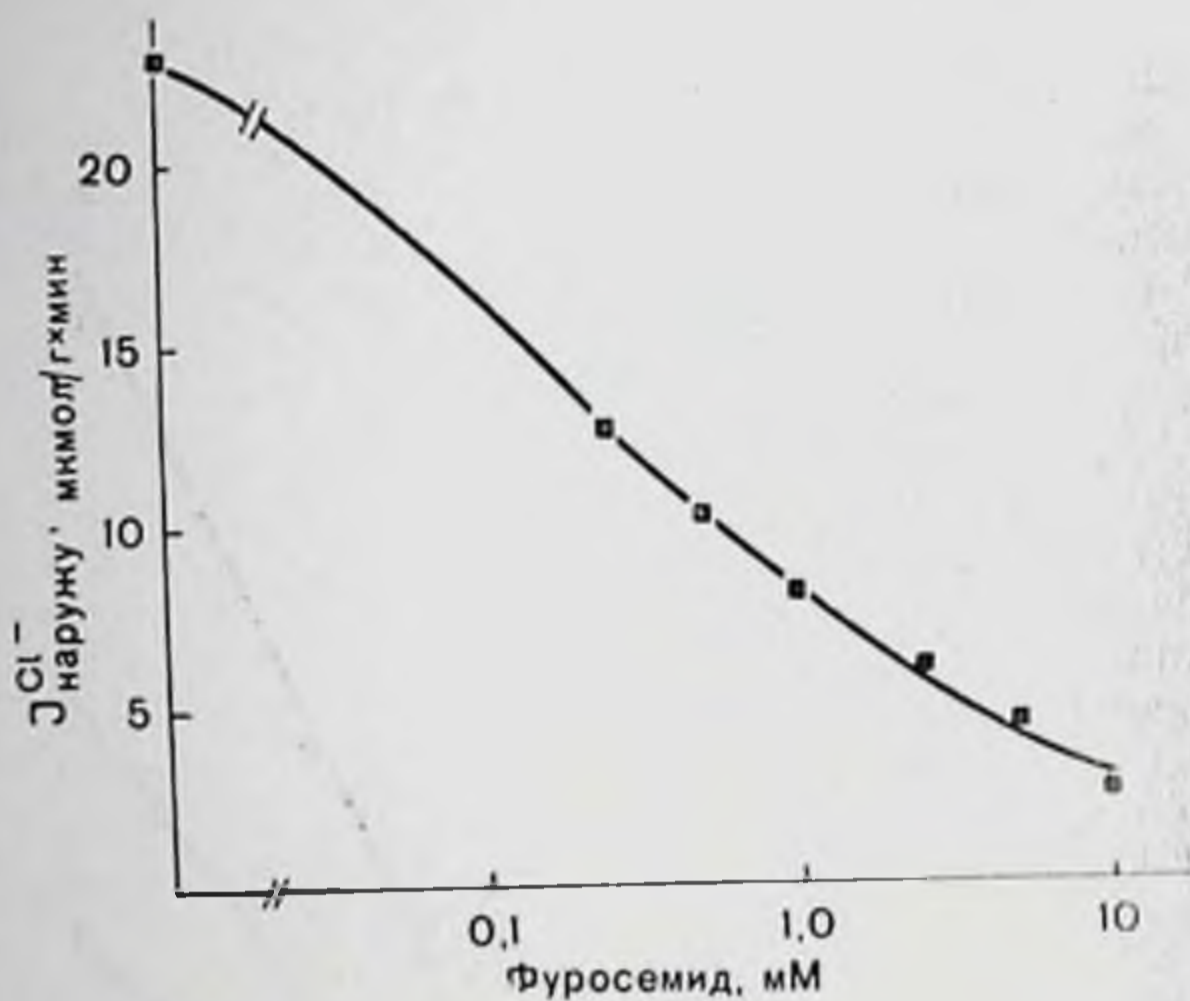


Рис. 125. Ингибирование общего выхода  $\text{Cl}^-$  под действием фуросемида. Выход  $\text{Cl}^-$  (мкмол/г·мин) представлен в зависимости от концентрации фуросемида. Клетки предварительно уравнивали в фосфатном буфере Кребса—Рингера, подвергали действию ингибитора метаболизма (0,4 мкМ антимицина А и 25 мкМ валиномицина) и затем переносили в среду с низкой концентрацией  $\text{Cl}^-$  рН 7,4, с 1% альбумином (16 мМ  $\text{Cl}^-$ , 120 мМ глюконата), в которой клетки инкубировали 5 мин при 37 °С с разными концентрациями фуросемида.

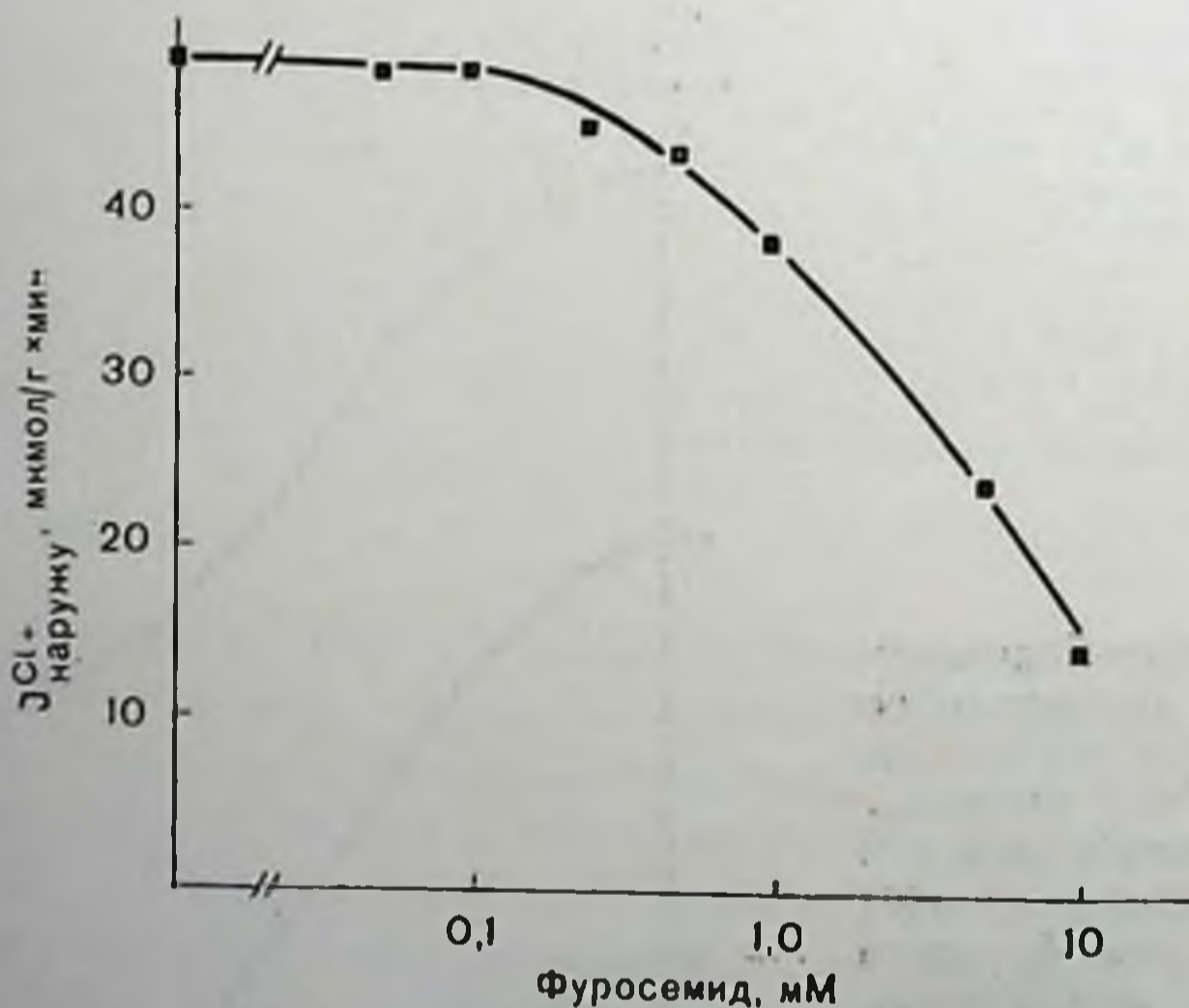


Рис. 126. Ингибирование одностороннего вытекания  $^{36}\text{Cl}^-$  под действием фуросемида. Односторонний выход  $^{36}\text{Cl}^-$  (мкмол/г·мин) представлен как функция концентрации фуросемида. Клетки предварительно инкубировали в фосфатном буфере Кребса—Рингера и затем метили  $^{36}\text{Cl}^-$ . Нагруженные клетки переносили в буфер, не содержащий радиоактивности, и инкубировали 3 мин при 37 °С в присутствии различных концентраций фуросемида.



5,5'-диметилноксазолидин-2,4-дион (ДОД) соответственно. Если бы внутриклеточный  $H^+$  распределялся равномерно, то как кислый, так и основной рН зонда должны дать одинаковую картину. Другими словами, при равновесии отношение распределения кислого и основного зондов должно равняться единице. Если с другой стороны, существуют какие-то уровни внутри клетки с различными рН, это отношение будет всегда больше единицы. Действительно, было показано, что оно составляет примерно 10 в аэробных условиях, но падает примерно до единицы после ингибирования метаболитами. Таким образом, распределение двух рН зондов, по-видимому, указывает на то, что во время метаболизма в клетке существуют два компартмента с разными рН, отличающимися примерно на единицу, но эта разница исчезнет при ингибировании метаболизма. Это наблюдение согласуется с тем, что протоны накачиваются во внутриклеточные компартменты по механизму, зависящему от метаболизма. В более поздних работах показано, что цитоплазма является более основным компартментом, тогда как более кислый до сих пор не идентифицирован [4]. При этих условиях цитоплазматическое рН, которое затем почти точно было определено с помощью ДОД, будет близко к нейтральному или слегка основному, так что протонам, чтобы двигаться в кислый компартмент и в окружающую среду, надо перемещаться по механизму активного транспорта. Однако не было показано, что такое образование кислоты зависит от концентрации внеклеточного калия. В настоящее время наиболее вероятным представляется, что  $KCl$  поглощается клеткой через электронейтральный симпорт. Это предположение, по всей видимости, подтверждается данными, что при добавлении фуросемида (2 мМ) общий ток как  $Cl^-$ , так и  $K^+$ -ионов уменьшается, тогда как на электрогенный насос ионов  $Na^+$  фуросемид действия не оказывает (рис. 122). Фуросемид ингибирует только 20—30% от общего поглощения

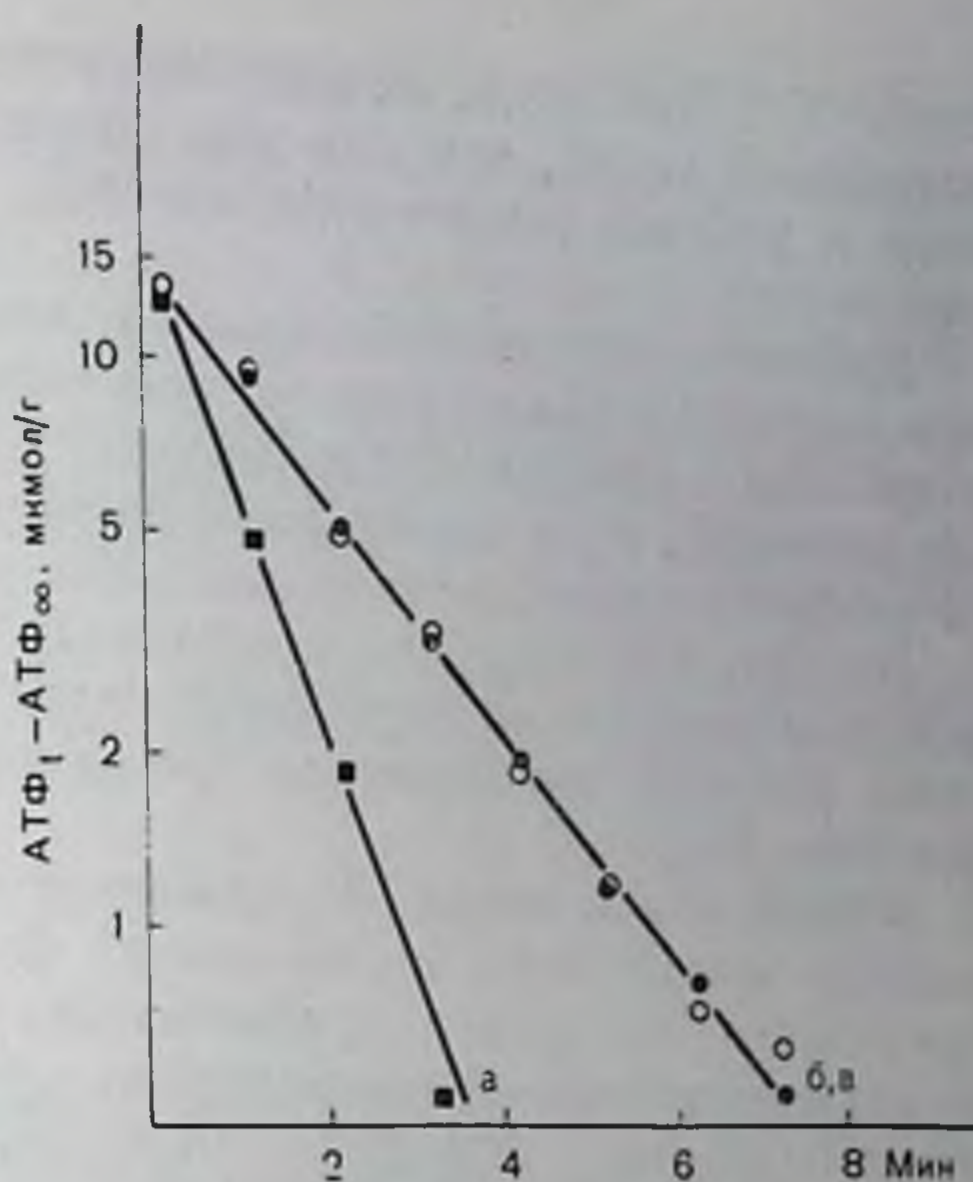


Рис. 127. Снижение содержания АТФ в клетках с недостатком  $K^+$  после ингибирования метаболитами. Содержание АТФ по сравнению с основным уровнем ингибированных клеток представлено в виде логарифма в зависимости от времени после добавления антимицина А.

К клеткам с недостатком  $K^+$  в фосфатном буфере Кребса—Рингера без калия (рН 7,4; 37 °С) добавляли буфер, содержащий: а — антимицин А (0,4 мкМ) и  $K^+$  (28 мМ); б — антимицин А (0,4 мкМ); в — антимицин А (0,4 мкМ),  $K^+$  (23 мМ), уабани (1,25 мМ).

ионов  $K^+$ . Эта часть, видимо, представляет собой убаиннечувствительный калий, так как при одновременном действии фуросемида и убаина можно добиться 90% ингибирования поглощения калия.

Действие двух ингибиторов на поглощение  $^{42}K^+$  в стационарном состоянии аналогично их действию на общий поток. Каждый ингибитор в отдельности ингибирует приток 40% (убаин) и 54% (фуросемид), в то время как вместе они практически полностью ингибируют приток калия (рис. 123).

На рис. 124 показана зависимость ингибирования притока калия от концентрации фуросемида; ингибирование на 50% в присутствии убаина наблюдается при концентрации фуросемида  $10^{-4}$  (см. рис. 124).

Общий поток ионов  $Cl^-$  из клеток в среду с низким его содержанием может быть ингибирован фуросемидом почти на 90%; кажущаяся  $K_m$  равна приблизительно  $2 \cdot 10^{-4}$  М (рис. 125). Наоборот стационарный ток меченого хлорида ингибируется на 50% при добавлении 5 мМ фуросемида (рис. 126). Кроме того, фуросемид оказывает побочное действие на односторонний ток натрия. Действие фуросемида на токи калия и натрия по нашим данным количественно совпадает с результатами, полученными Туррег.

Данные о потоках калия и хлора, по всей вероятности, указывают на то, что ингибиторное действие фуросемида проявляется по механизму прямого воздействия на транспорт калия.

В конечном результате количество  $K^+$  и  $Cl^-$  внутри клетки несколько превышает наружную концентрацию. Однако неясно, является ли «парадоксальное» поглощение  $KCl$  активным транспортным процессом. С одной стороны, он зависит от присутствия внутриклеточного АТФ, а с другой — не удалось показать, что АТФ при этом процессе расходуется (рис. 127).

Описанные результаты подтверждают существование механизма  $K^+-Cl^-$  симпорта в клетках Эрлиха, который специфично ингибируется фуросемидом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crane R. K. Hypothesis of the mechanism of intestinal active transport of sugars. — Fed. Proc., 1962, 21, 891—895.
2. Eddy A. A., Philo R. Amino acid absorption by mouse ascites tumor cells as an electrogenic process. — In: Amino Acid Transport and Uric Acid Transport, ed. by Silbernagl, F. Lang, R. Greger, 1976, p. 27—33. Georg Thieme, Stuttgart.
3. Geck P., Heinz E., Pietrzyk C. The membrane potential of Ehrlich cells and its significance for active amino acid transport. — In: Amino Acid Transport and Uric Acid Transport, ed. by S. Sidbergnal, F. Lang, R. Greeger, 1976, p. 33—39. Georg Thieme, Stuttgart.
4. Geck P., Pietrzyk C., Heinz E., Pfeiffer B.  $H^+$  secretion in Ehrlich cells. — Acta Physiol. Scand., 1977 (in press).
5. Gibb L. E., Eddy A. A. An electrogenic sodium pump as a possible factor leading to the concentration of amino acids by mouse ascites tumor cells

- with reversed sodium ion concentration gradients. — *Biochem. J.* 1972, 129, 979—981.
6. Heinz E., Geck P., Pietrzyk C. Driving forces of amino acid transport in animal cells. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 264, 428—441.
  7. Heinz E., Geck P., Pietrzyk C., Burckhardt G., Pfeiffer B. Energy sources for amino acid transport in animal cells. — *J. Supramol. Struct.*, 1977, 6, 125—133.
  8. Heinz E., Geck P., Pietrzyk C., Pfeiffer B. Electrogenic ion pump as an energy source for active amino acid transport in Ehrlich cells. — In: *Biochemistry of Membrane Transport*, FEBS Symposium No. 42, ed. by G. Seamenza, E. Carafoli, 1977, p. 236—249. Springer — Verlag, Berlin — Heidelberg.
  9. Schafer J. A., Heinz E. The effect of reversal of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  electrochemical potential gradients on the active transport of amino acids in Ehrlich ascites tumor cells. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 249, 15—33.
  10. Tupper J. T. Cation fluxes in the Ehrlich ascites tumor cell. Evidence for  $\text{Na}^+$  for  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  for  $\text{K}^+$  exchange diffusion. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 394, 586—596.

### РЕКОНСТРУКЦИЯ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ СВОЙСТВ СОПРЯЖЕННОГО С ГРАДИЕНТОМ НАТРИЯ ПЕРЕНОСЧИКА ГЛЮКОЗЫ В ЩЕТОЧНОЙ КАЕМКЕ ПОЧЕЧНОЙ МЕМБРАНЫ

П. МАЛАТИ, Х. ПРЕЙЗЕР, П. ФЭРКЛОХ, Р. К. КРЕЙН  
(P. MALATHI, H. PREISER, P. FAIRCLOUGH, R. K. CRANE)

*Отделение физиологии, Колледж медицины и стоматологии Нью-Джерси,  
Рутгерская школа медицины, Пискатавэй, Нью-Джерси 08854, США*

Градиентная гипотеза, начавшая свое развитие в конце 50-х — начале 60-х годов, представляет собой концепцию трансформации энергии при транспорте через мембрану, опосредованной нековалентным сопряжением транспорта растворенных веществ с ион-

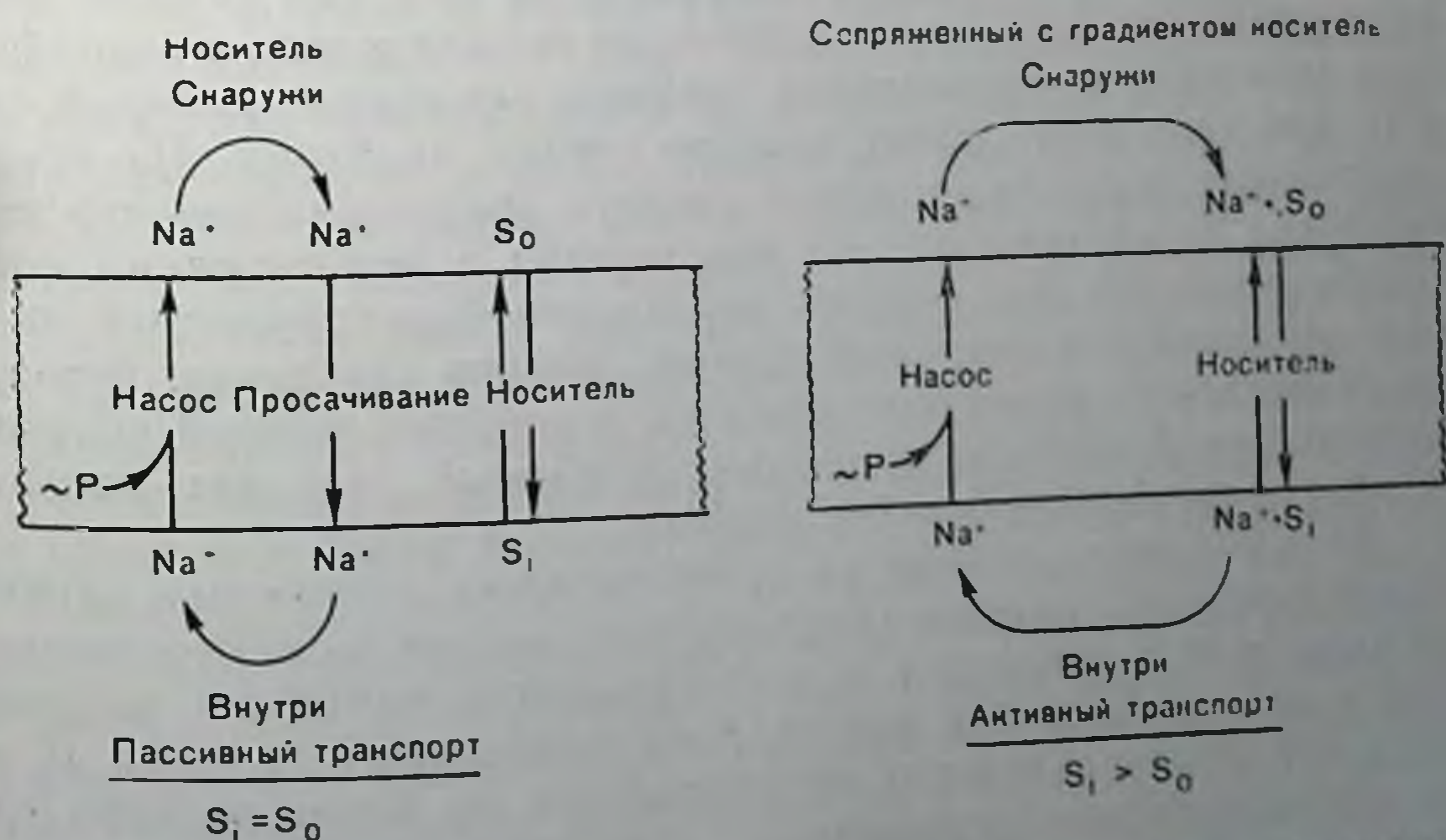


Рис. 128. Сравнение сопряженного с градиентом носителя с носителем Widdas. По данным Crane [2].

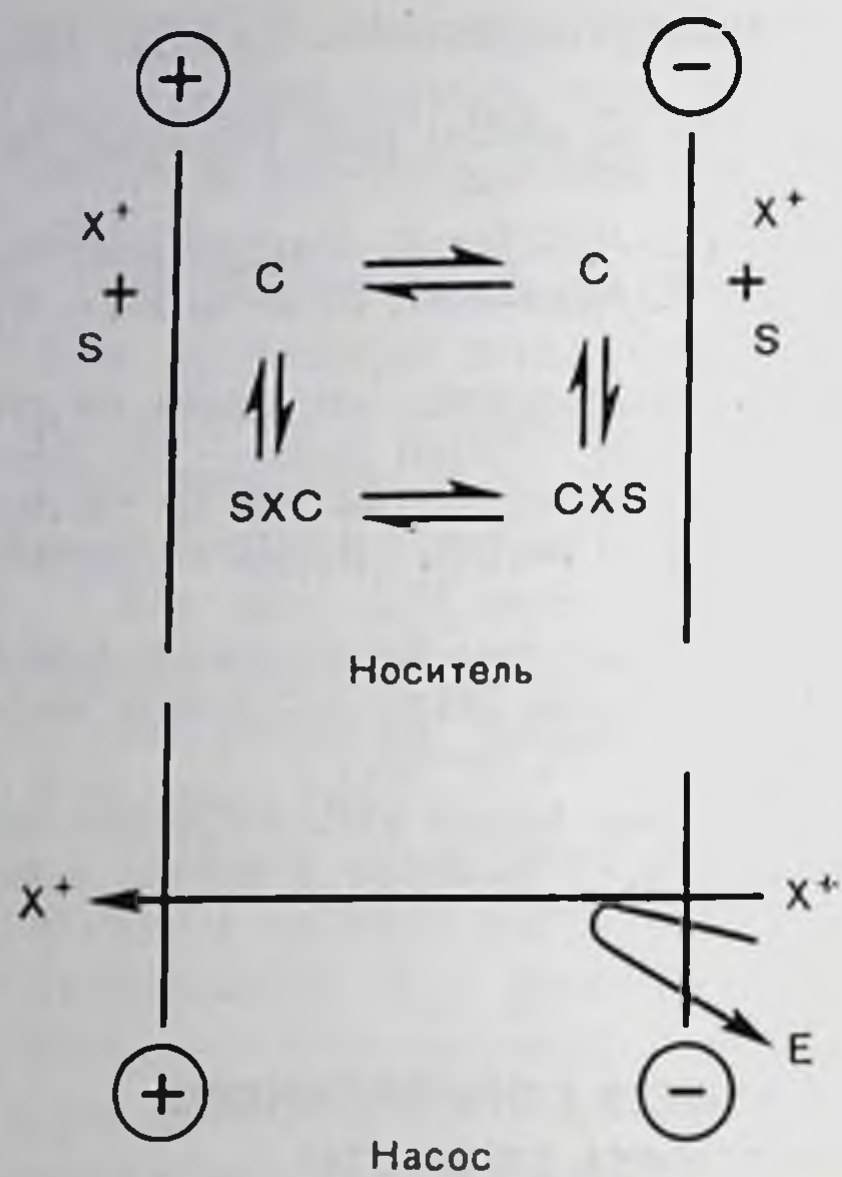


Рис. 129. Основная модель гипотезы градиента. По данным Crane [4].

разнообразны. Они меняются от мембраны к мембране, зависят от сопряженного иона системы, от субстрата. Таким образом, анализ всех характеристик этой системы требует пристального изучения большого числа кинетических особенностей, на которые оказывают влияние как собственные свойства системы, так и окружение, в котором она находится. Однако для идентификации присутствия градиентсопряженного переносчика достаточно характеристик, которые описывают модель, приведенную на рис. 129. В этой модели указывается, что катион и субстрат связываются со специфическим носителем с образованием тройного комплекса, который служит для транспорта обоих веществ через мембрану. На основе полученных результатов можно сделать предположение, что вход субстрата будет зависеть от присутствия и концентрации иона. Подразумевается, что степень накопления будет функцией энергии, имеющейся в трансмембранном ионном градиенте, который устанавливается указанным насосом, и энергии, которой обладает электрический ионный потенциал мембраны, так как катионы движутся на переносчике без анионов.

До последнего времени не представлялось возможным изучать характеристики градиентсопряженных систем на искусственных моделях и использовались только природные мембраны, полученные в виде либо целых клеток, либо мембранных везикул. В результате наших успешных экспериментов по реконструкции градиентсопряженного переносчика глюкозы из мембран кишки и щеточной каемки почки в искусственных липосомах мы получили возможность изучать эти системы более широко [6—8]. В частно-

ным транспортом. Концепция согласуется с традиционными сведениями о мобильном, опосредованном носителе транспорта. Впервые была сделана попытка объяснить, как глюкоза может активно переноситься через мембрану щеточной каемки кишки в мембрану почечных эпителиальных клеток и неактивно переноситься в другие животные клетки, такие, как эритроциты или клетки Эриха с асцитной опухолью, несмотря на то, что механизмы, лежащие в основе обоих видов переноса, очень близки. Решение, предлагаемое градиентной гипотезой, приведено на рис. 128 [2, 4, 9].  $\text{Na}^+$  и глюкоза переносятся в одно время и одним носителем (переносчиком).

Характеристики реального градиентсопряженного транспорта

сти, это позволило создать метод выделения и очистки подобных переносчиков. Хорошо известно, что химическое мечение подобного рода, как реакция активного центра с  $^{14}\text{C}$ -ЭМИ, предложенное Fox и Kennedy [10] и использованное другими авторами для почек и кишки [19, 21], имеет один очень существенный недостаток, а именно в процессе реакции активность переносчика необратимо падает. Реконструкция позволяет избежать такой потери активности путем создания двух водных компартментов, отделенных друг от друга липидальным барьером, имитирующим природные условия для изучения транспорта.

Таким образом, наши исследования до сих пор, за исключением реконструкции кишечной транспортной функции глюкозы и транспорта аланина в почке, были направлены на изучение переносчика глюкозы мембраны щеточной каемки почки кролика. Некоторые соответствующие характеристики, предсказанные для реконструированного переносчика, исходя из модели, представленной на рис. 129, приведены в табл. 27.

Т а б л и ц а 27. Характеристики носителя глюкозы из мембраны щеточной почечной каемки

- 
1. Специфичен для D-глюкозы, но не для L-глюкозы
  2. Чувствителен к флоризицину
  3.  $\text{Na}^+$ -зависим
  4.  $\text{Na}^+$ -поток электрогенен
  5. Обратим
  6. Стехиометрия между сахаром и натрием
- 

Мы использовали модифицированные для наших целей общие методики получения липосом из соевых фосфолипидов, описанные Racker [16], Kagawa и Racker [12], Kasahara и Hinkle [13], а также методы Schmitz, Preiser, Maestrassi, Ghosh и Crane [18] для получения мембран щеточной каемки. Общая схема эксперимента приведена на рис. 130. Подробное описание опыта дано в [6, 7]. Однако необходимо отметить некоторые детали. В реконструированных липосомах ионный градиент и мембранный потенциал, которые вместе приводят в движение транспорт (см. рис. 129), задаются исследователем. Внутреннее ионное окружение липосом будет представлять среду, в которой липосомы были получены. Внешнее ионное окружение можно регулировать, меняя среду инкубации в соответствии с задачами эксперимента.

В предыдущих работах [5—7] нами было показано, что липосомы, реконструированные с белками, полученными экстракцией тритоном X-100 из мембран щеточной каемки почек кролика и содержащие в качестве внутренней среды KCl, обладают первыми тремя характеристиками из приведенных в табл. 27, т. е. существует  $\text{Na}^+$ -зависимое поглощение D-глюкозы липосомами; поглощение L-глюкозы минимально и не зависит от ионов натрия. Кроме того, флоризицин подавляет уровень  $\text{Na}^+$ -зависимого поглощения

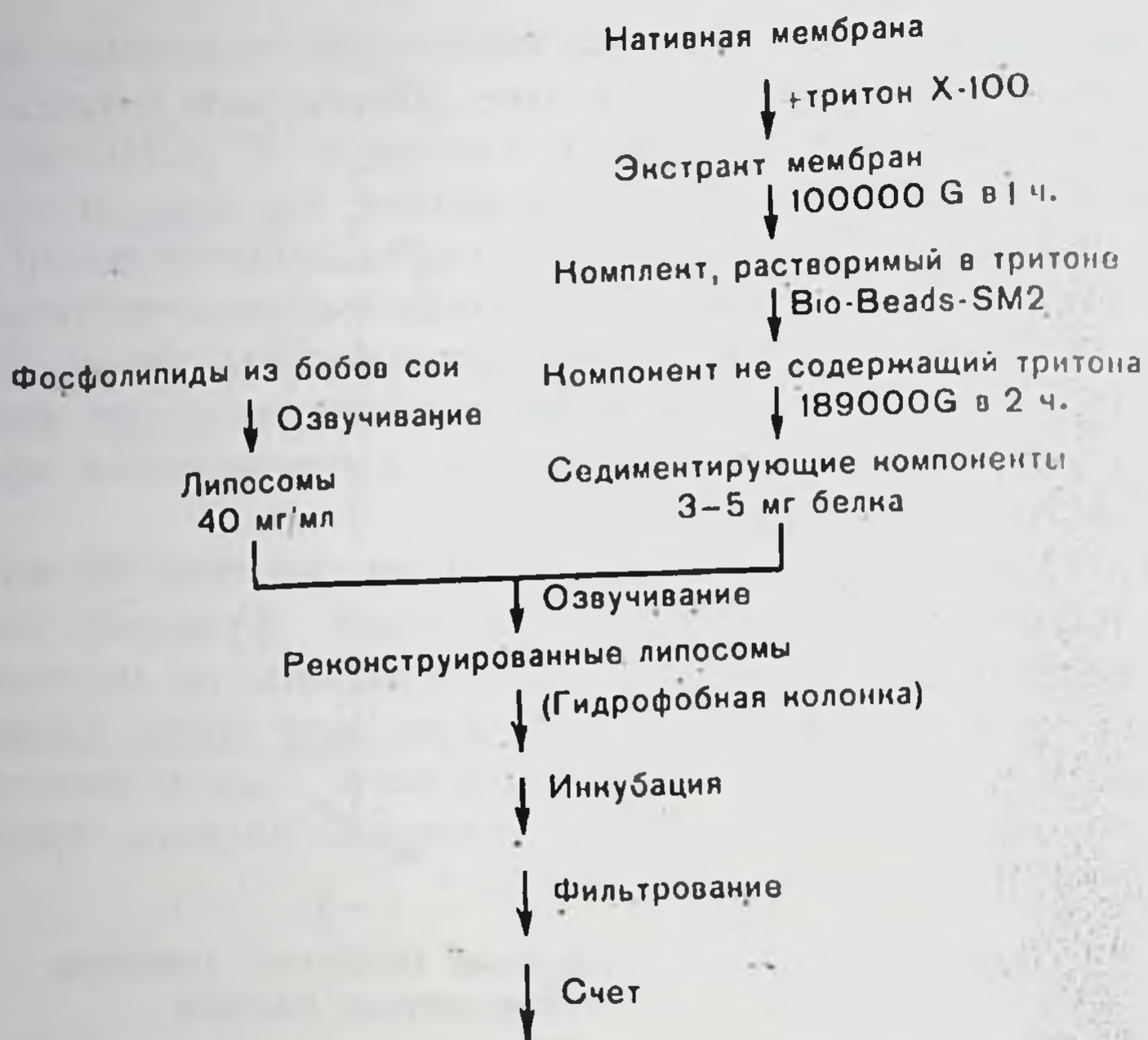


Рис. 130. Схема реконструкции экстрагированных тритоном X-100 мембранных белков в озвученные липосомы.

D-глюкозы до уровня, равного или близкого к уровню поглощения L-глюкозы.  $K_m$  для D-глюкозы составляет 0,125—0,155 мМ. Обычно в качестве внешнего, липорастворимого аниона мы использовали  $SCN^-$ , чтобы обеспечить парный ион для  $Na^+$ , который связан с переносчиком. Ион  $Cl^-$  также эффективен, но в меньшей степени и его эффективность, вероятнее всего, зависит от реконструкции в грубом экстракте переносчика  $Cl^-$  параллельно реконструкции переносчика глюкозы и др.

В предыдущей публикации мы описывали [5] лучшую (пятикратную) очистку переносчика путем пропускания грубого экстракта через колонку с копкавалин А-сефарозой и последующей двукратной очисткой при обработке реконструированных липосом папаином. Мы также показали, что система может быть использована в качестве пробы на транспорт. Иными словами, поглощение сахара, видимо, происходит во внутреннем пространстве липосом и его скорость пропорциональна количеству повторно включенного белка, если соотношение белок : липид не превышает 1 : 10. Однако такой важной особенностью транспорта глюкозы, которая была обнаружена при исследовании природных мембранных частиц, как «овершут», реконструированные в использованных нами условиях липосомы не обладают.

«Овершут» является термином, который был использован для описания кратковременного поглощения D-глюкозы сверх конечной точки системы. В нативных мембранах «овершут» вызывается тем, что происходит кратковременное возрастание мембранного потенциала в направлении, поддерживающем приток и создающем

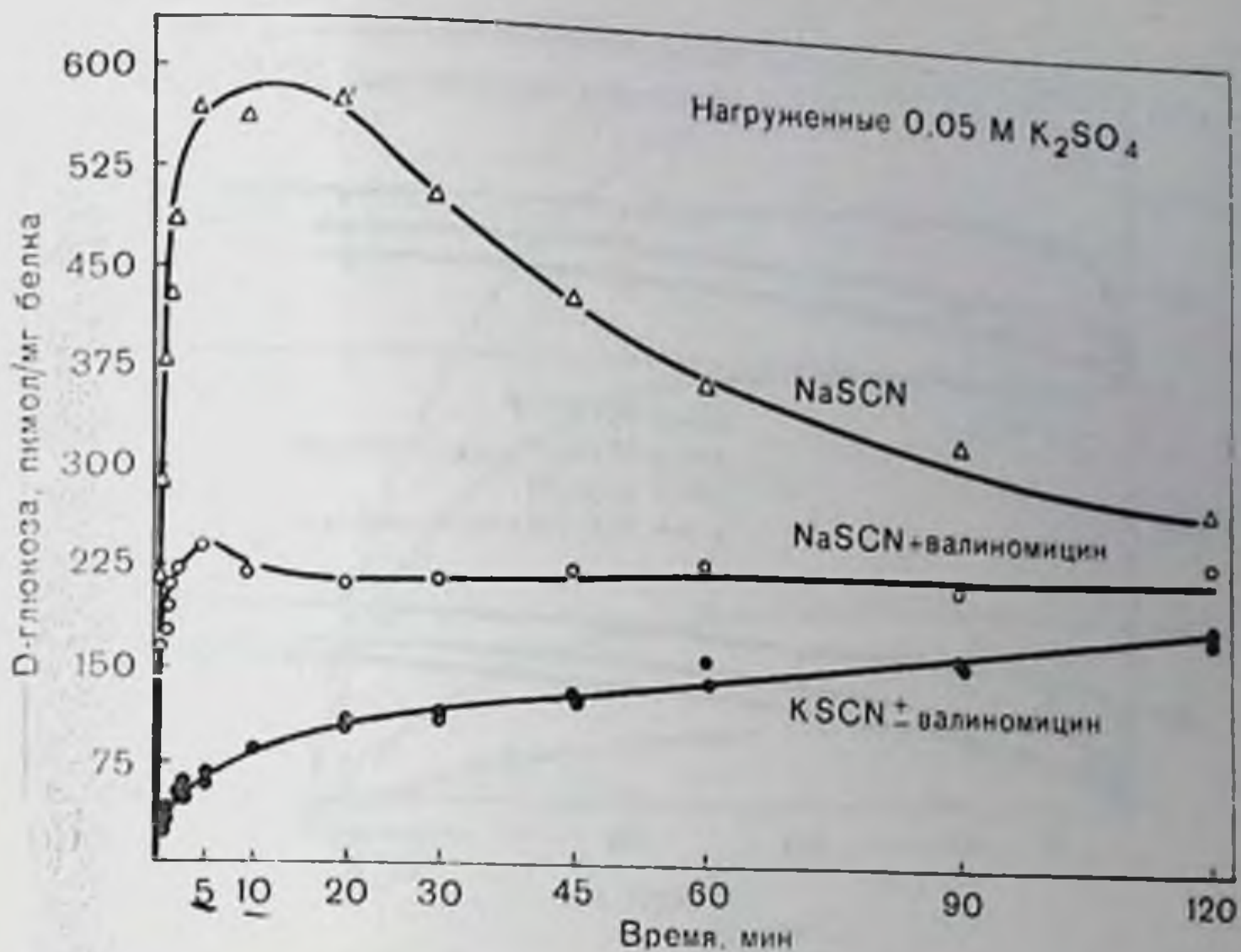


Рис. 131. Демонстрация «овершута» с внутренним  $\text{SO}_4^{2-}$  и внешним  $\text{Cl}^-$ . Экстрагированные тритоном X-100 мембранные белки были реконструированы с фосфолипидами из соевых бобов в  $0,05 \text{ M K}_2\text{SO}_4$ ,  $5 \text{ mM HEPES-tris}$ ,  $1 \text{ mM DTT}$ . Инкубацию проводили при комнатной температуре, общий объем  $650 \text{ мкл}$ . Инкубационная среда содержала  $0,2 \text{ mM D} = [\text{U} - ^{14}\text{C}]$ -глюкозы,  $0,1 \text{ M NaSCN}$  или  $\text{KSCN}$  и  $5 \text{ mM HEPES-tris}$  ( $\text{pH } 7,5$ ). Предварительно валиномицин ( $25 \text{ мкг}$ ) инкубировали с  $300 \text{ мкл}$  липосом в течение  $30 \text{ мин}$ . Реакцию инициировали добавлением  $100 \text{ мкл}$  реконструированных липосом.

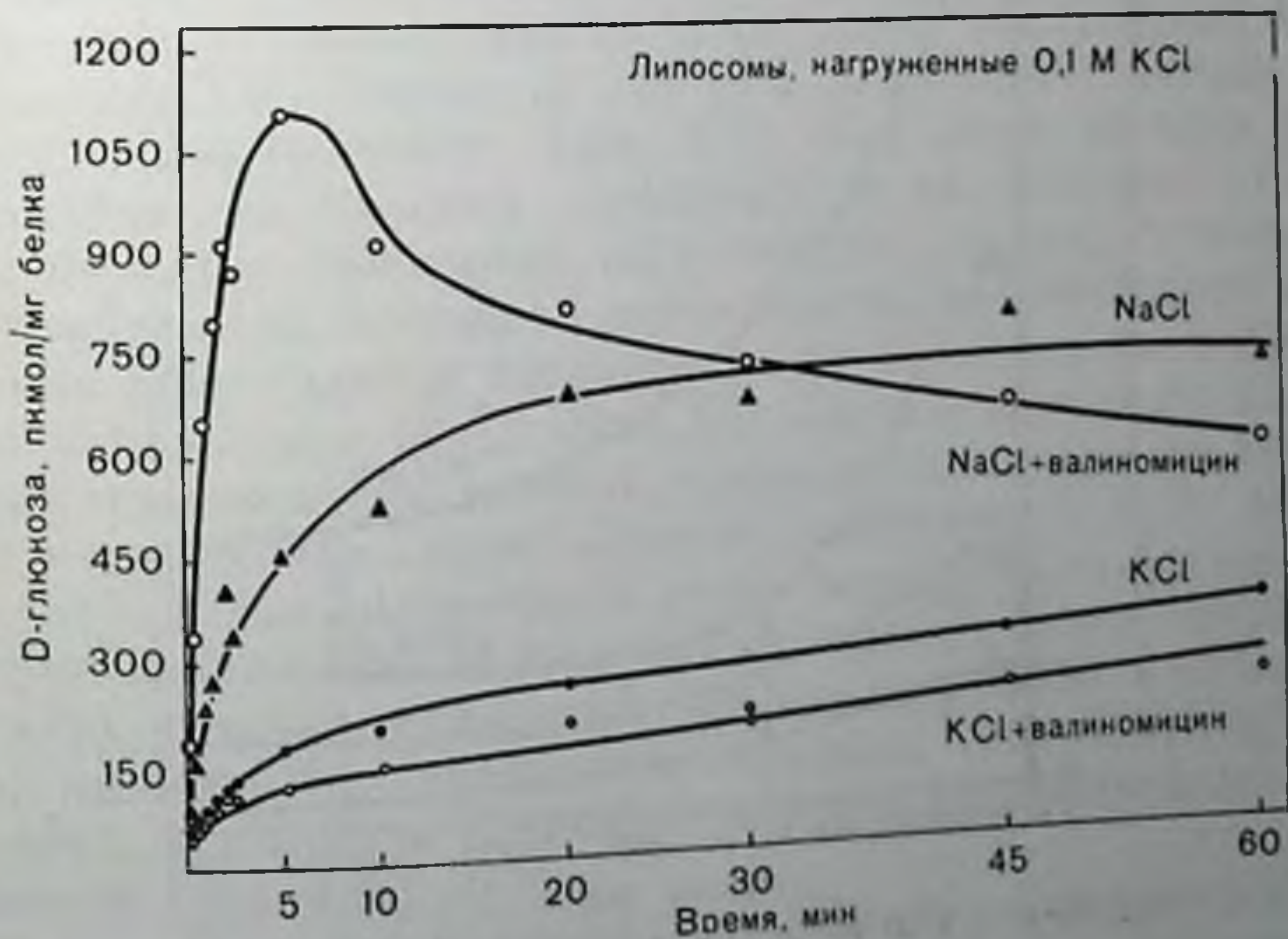


Рис. 132. Демонстрация «овершута» с внутренним  $\text{Cl}^-$  и добавлением валиномицина. Эксперимент проводили по принципу, описанному в подписи к рис. 131, заменяя  $\text{Cl}^-$  на  $\text{SO}_4^{2-}$  и  $\text{SCN}^-$ .

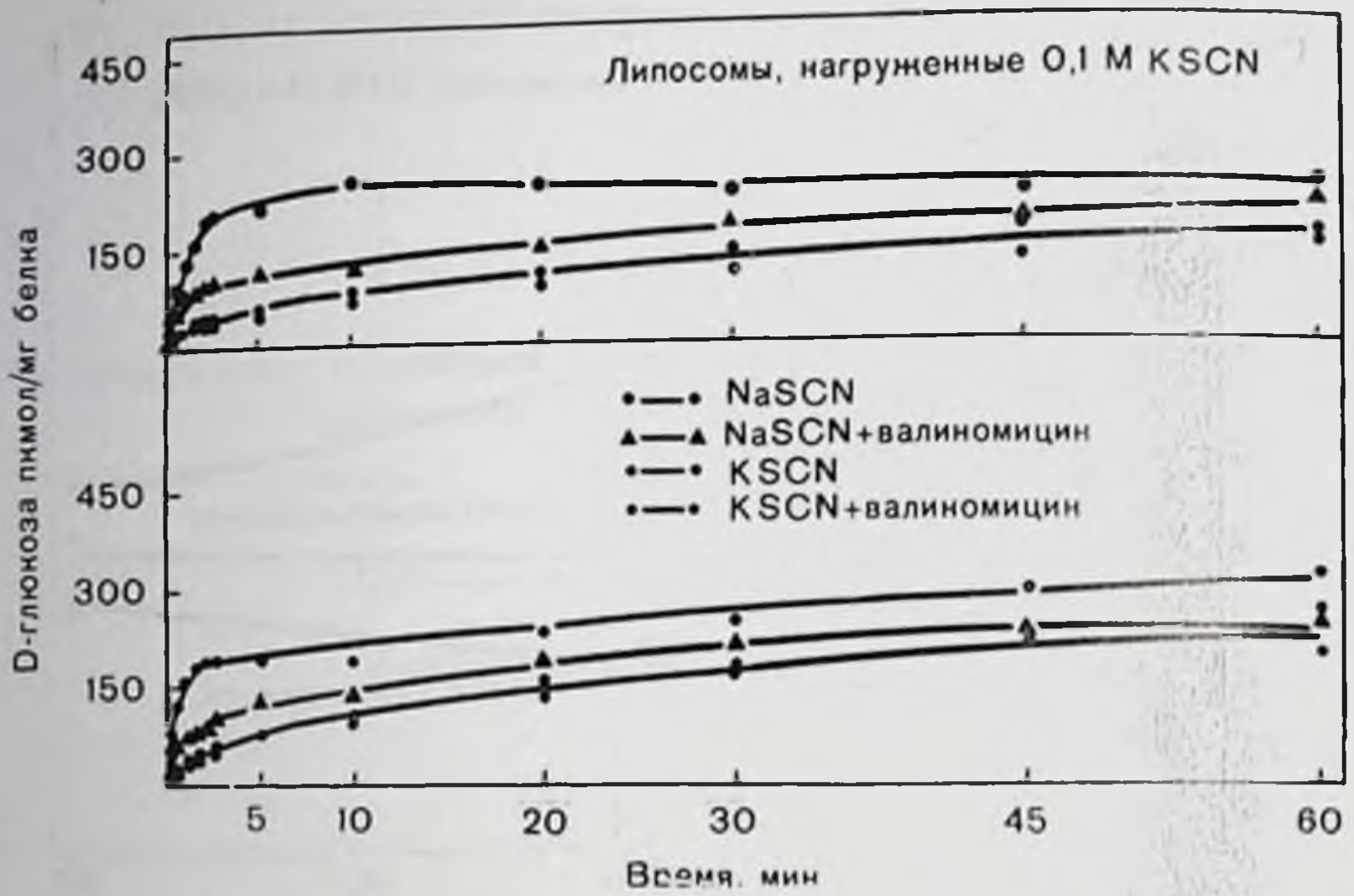


Рис. 133. Отсутствие «овершута» с внутренним и внешним  $\text{SCN}^-$ . Детали эксперимента см. рис. 131; заменили  $\text{SCN}^-$  на внутренний  $\text{SO}_4^{2-}$ .

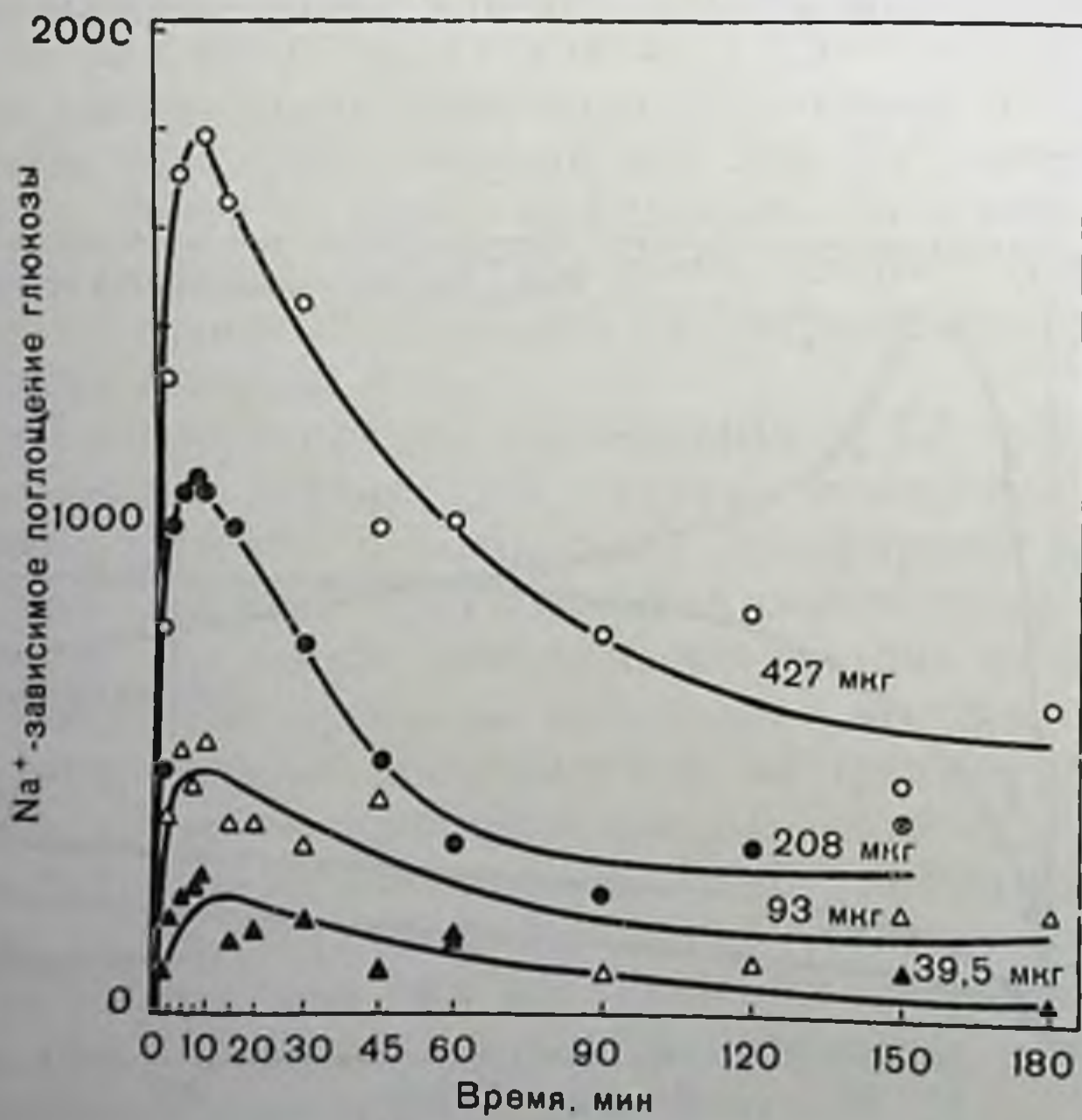


Рис. 134. Влияние концентрации мембранных белков, экстрагированных тритоном X-100, на степень «овершута». Детали эксперимента см. рис. 131; варьировали количество включенного белка (количество указано на рисунке).



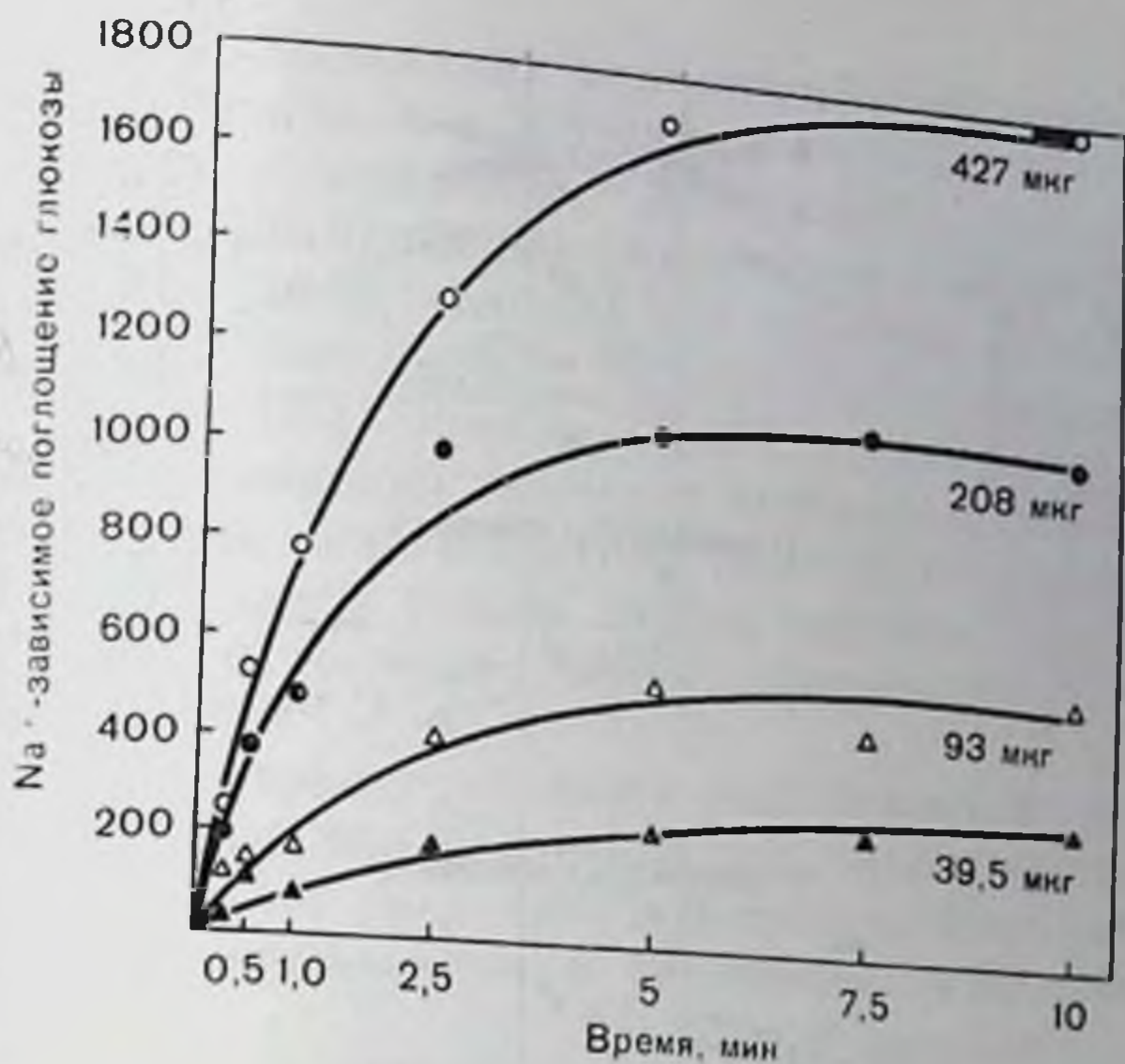


Рис. 135. Влияние концентрации белков, экстрагированных тритоном X-100, на поглощение D-глюкозы во время фазы (стадии) «овершута». Используются данные, представленные на рис. 134, для первых 10 мин.

на мгновенное состояние активного переноса глюкозы внутрь. Наиболее часто используемые методы состояли в создании градиента внутрь липорастворимого аниона  $\text{SCN}^-$  или вызывании тока  $\text{K}^+$  наружу добавлением валиномицина [1, 15].

Как было отмечено, условия градиента  $\text{SCN}^-$  внутрь были воспроизведены в наших ранних работах без появления «овершута». Во всех ранних экспериментах в качестве внутреннего аниона использовали  $\text{Cl}^-$ . Замена  $\text{Cl}^-$  на  $\text{SO}_4^{2-}$  при прочих равных условиях вызывала «овершут» (рис. 131). Как видно из этого рисунка, действие внутреннего градиента в значительной степени устраняется при добавлении валиномицина: видимо, в этих условиях мембранный потенциал резко падает, причем только в первое время еще остаются незначительные признаки этого эффекта. Однако липосомы с внутренним  $\text{Cl}^-$  хорошо реагируют на валиномицин только в тех случаях, когда внешним ионом является относительно менее подвижный по сравнению с  $\text{SCN}^-$  ион  $\text{Cl}^-$  (рис. 132). Когда мы имеем в обоих компартментах ионы  $\text{SCN}^-$ , транспорт минимален независимо от присутствия валиномицина (рис. 133). Степень «овершута», вызываемого  $\text{SCN}^-$  с внутренним  $\text{SO}_4^{2-}$ , зависит от количества повторно включенного белка (рис. 134), и в стадии подъема «овершут» пропорционален этому количеству (рис. 135).

Явление «овершута» может быть связано с электрогенной природой тока натрия на носителе (переносчике), который как было предсказано, реагирует на возрастание мембранного потенциала [1, 15]. Прямые измерения потенциала во время «овершута» в природных частицах для сахаров до сих пор не опубликованы и

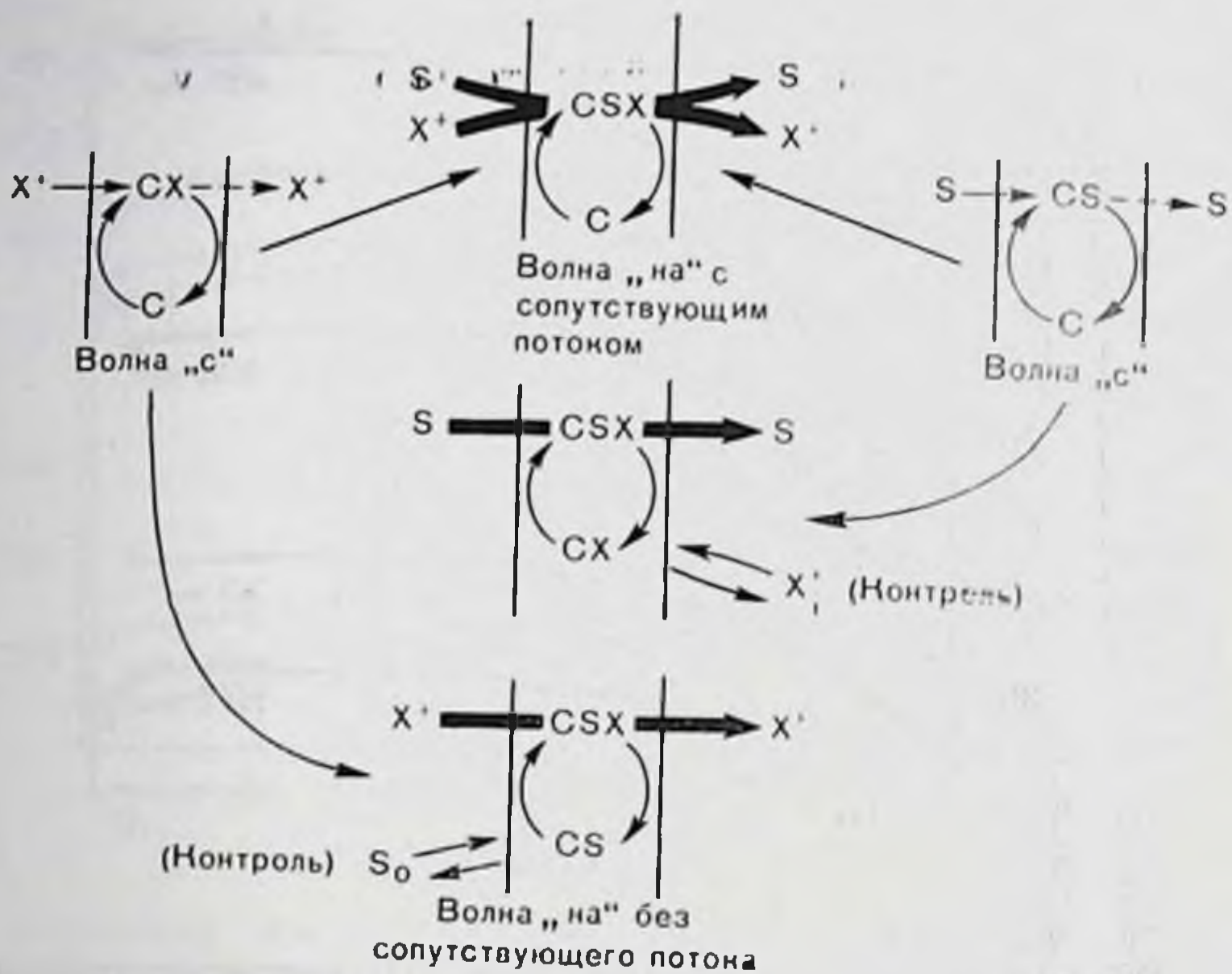


Рис. 136. «Волновые» эффекты градиентсопряженного носителя [4].

до настоящего времени не сделаны в нашей работе, хотя Lever [14] измерял мембранный потенциал, приводящий в движение транспорт нейтральных аминокислот в плазматических мембранных частицах фибробласта. Предполагая, что кратковременное увеличение мембранного потенциала можно считать корректным объяснением явления «овершута», здесь имеет смысл напомнить, что электрогенный, сопряженный с градиентом переносчик при определенных условиях может выступать в роли «главных ворот» для субстратзависимого натрия, действующих аналогично описанным нейротрансмиттерам [11, 17]. Этот аспект поведения сопряженного с градиентом носителя обсуждался ранее [3, 4].

На рис. 136 основные характеристики сопряженного с градиентом носителя изображены таким образом, чтобы подчеркнуть волнообразный характер его действия. При работе переносчика в обычных условиях может существовать маленький трансмембранный ток одного из переносимых «пассажиров» пона или субстрата в отсутствие другого. Однако при добавлении второго «пассажира» оба потока быстро пересекают мембрану, как и можно ожидать, исходя из данных рис. 129. Однако имеются условия, при которых ток только одного «пассажира» может возрасти в присутствии обоих. Это происходит, когда один из «пассажиров» отрывается от переносчика очень медленно. Добавление медленного отрывающегося компонента приведет к индуцированию тока только другого компонента. Эти условия особенно реальны в случае медленно отрывающегося субстрата, когда происходит трансмембранный ток ионов, вызванный присутствием субстрата. Активного транспорта не наблюдается. Потенциальная возможность

такого действия сопряженных переносчиков подтверждается описанным случаем, когда оно действительно реализуется. Это  $\text{Na}^+$ -зависимая система мелибиоза в *Salmonella typhimurium* [20]. В этой системе п-нитрофенил- $\alpha$ -галактозид (ПНФГ) является ингибитором мелибиоза, который не проходит сквозь мембрану, так что (ПНФГ) конкурирует с мелибиозом за вход, но сам в клетку не входит [22]. Однако ПНФГ «включает» ток натрия внутрь. После проведения опытов с предварительной нагрузкой мембранных частиц меченым ПНФГ было установлено, что радиоактивный ПНФГ затем входит внутрь частицы, вероятно, в связи с тем, что внутренний ПНФГ способствует его отрыванию [23].

Описанное явление представляет особый интерес для этой книги и вопрос, который можно здесь задать, таков: должны ли очень сильно отличаться по типу своего действия сопряженные с градиентом натрия переносчики и рецепторы нейротрансмиттеров?

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beck J. C., Sacktor B. Energetics of the  $\text{Na}^+$  dependent transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. — J. Biol. Chem., 1975, 250, 8674—8680.
2. Crane R. K. Hypothesis of mechanism of intestinal active transport of sugars. — Fed. Proc., 1962, 21, 891.
3. Crane R. K. Gradient coupling and the membrane transport of water soluble compounds: A general biological mechanism? — In: Colloquia on the Protides of the Biological Fluids, v. XV, ed. by H. Peeters, 1967, p. 227. Elsevier, Amsterdam.
4. Crane R. K. The gradient hypothesis and other models of carrier-mediated active transport. — Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 1977, 78, 99—159.
5. Crane R. K., Fairclough P., Malathi P., Preiser H. Some characteristics of the kidney  $\text{Na}^+$ -dependent glucose carrier reconstituted into sonicated liposomes. — APS, 1977 (in press).
6. Crane R. K., Malathi P., Preiser H. Reconstitution of specific  $\text{Na}^+$ -dependent D-glucose transport in liposomes by Triton X-100 extracted proteins from purified brush border membranes of rabbit kidney cortex. — FEBS Lett., 1976, 67, 214—216.
7. Crane R. K., Malathi P., Preiser H. Reconstitution of specific  $\text{Na}^+$ -dependent D-glucose transport in liposomes by Triton X-100 extracted proteins from purified brush border membranes of hamster small intestine. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 71, 1010—1016.
8. Crane R. K., Malathi P., Preiser H. Reconstitution of  $\text{Na}^+$  gradient-coupled carrier functions of brush border membranes of intestine and kidney in sonicated liposomes. — In: Biochemistry of Membrane Transport. FEBS Symposium No. 42, ed. by G. Semenza, E. Carofoli, 1977, p. 261—268, Springer — Verlag, Heidelberg.
9. Crane R. K., Miller D., Bihler I. The restrictions on the possible mechanisms of intestinal active transport of sugars. — In: Membrane Transport and Metabolism, ed. by A. Kleinzeller, A. Kotik, 1961, p. 439. Czechoslovak Academy of Science Press, Prague.
10. Fox C. F., Kennedy E. P. Specific labeling and partial purification of the M protein, a component of the  $\beta$ -galactoside transport system of *Escherichia coli*. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 891—899.
11. Freeman A. Polyfunctional role of glutamic acid in excitatory synaptic transmission. — Prog. Neurobiol., 1976, 6, 137—153.
12. Kagawa Y., Racker E. Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. — J. Biol. Chem., 1971, 246, 5477—5487.

13. *Kasahara M., Hinkle P. C.* Reconstitution of D-glucose transport by a protein fraction from human erythrocytes in sonicated liposomes. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 396—400.
14. *Lever J. E.* Membrane potential and neutral amino acid transport in plasma membrane vesicles from Simian Virus 40-transformed mouse fibroblasts. — *Biochemistry*, 1977, 16, 4328—4334.
15. *Murer H., Hopfer U.* Demonstration of electrogenic Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose transport in intestinal brush border membranes. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 484—488.
16. *Racker E.* A new procedure for the reconstitution of biologically active phospholipid vesicles. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 55, 224—230.
17. *Rang H. P.* Acetylcholine receptors. — *Quart. Rev. Biophys.*, 1975, 7, 283—399.
18. *Schmitz J., Preiser H., Maestracci D., Ghosh B. K., Cerda J. J., Crane R. K.* Purification of the human intestinal brush border membrane — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 323, 98—112.
19. *Smith M. W., Ferguson D. R., Burton K. A.* Glucose and phlorizin protected thiol groups in pig intestinal brush border membrane. — *Biochem. J.*, 1975, 147, 617—619.
20. *Stock J., Roseman S.* A sodium-dependent sugar co-transport system to bacteria. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 44, 132—138.
21. *Thomas L.* Isolation of N-ethylmaleimide-labelled phlorizin-sensitive D-glucose binding protein of brush border membrane from rat kidney cortex. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 291, 454—464.
22. *Tokuda H., Kaback H. R.* Sodium-dependent methyl 1-thio-β-D-galactopyranoside transport in membrane vesicles isolated from *Salmonella typhimurium*. — *Biochemistry*, 1977, 16 (10), 21—30.
23. *Tokuda H., Kaback H. R.* (In preparation).

## СТЕХИОМЕТРИЯ РЕКОНСТРУИРОВАННОГО НАТРИЕВОГО НАСОСА

БЕАТРИС М. АНЬЕ  
(BEATRICE M. ANNER)

*Отделение клеточной биофизики, Бейлорский колледж медицины  
и Фондрен-Броуновский исследовательский и учебный центр  
сердечно-сосудистых заболеваний Методистского госпиталя,  
Хьюстон, Техас 77030, США*

## СТЕХИОМЕТРИЯ НАТИВНОГО НАТРИЕВОГО НАСОСА

В нативных эритроцитах при действии Na, K-насоса на 3 иона натрия, выходящих из клетки, приходится 2 иона калия, переносимых внутрь клетки, на каждую гидролизованную молекулу АТФ. Эта стехиометрия поддерживается независимо от величины или направления ионного градиента [6, 28, 31]. В других тканях это соотношение, несмотря на некоторые отклонения в основном сохраняется [2, 4, 5]. Эти отклонения либо могут быть связаны с природой самого насоса либо их можно отнести за счет технических трудностей при измерении потоков. Натриевый насос выполняет множество функций, так как перенос с помощью насоса не ограничивается только контролем за трансмембранным градиентом K и Na, но он также включен в трансэпителиальный перенос натрия и калия. Действительно, концентрация активных центров

насоса, измеренная по связыванию уабанна, в почках примерно на три порядка выше, чем в эритроцитах [3]. Учитывая различные функции натриевого насоса, возникает вопрос о возможности существования различных форм Na, K-насоса. На клеточном уровне описано по меньшей мере пять типов действия натриевого насоса, которые зависят от внутриклеточного соотношения АТФ/АДФ :  $P_{неорг}$ . Современные представления о натриевом насосе описаны [9]. Что касается трансэпителиального транспорта, была постулирована также возможность существования дополнительных насосов. Например, в канальцах почек перенос натрия сопровождается переносом ионов хлора [7]. Поэтому на функциональном уровне наблюдаются некоторые отклонения от обычной стехиометрии. Возникает вопрос, обусловлены ли нарушения функционального характера изменениями в составе.

### СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ Na, K-АТФ-АЗЫ

В течение долгого времени считалось, что Na, K-АТФ-аза представляет собой Na, K-насос [29] и последние эксперименты подтвердили, что фермент действительно обладает способностью к транспорту калия и натрия, которая зависит от АТФ и ингибируется уабанном [12, 30]. Na, K-АТФ-аза была выделена из большого числа различных источников, таких как кролики, овцы, мозг собаки [11, 16, 18, 22], головной мозг свиньи [24], ректальная железа акулы [13] и носовая солевая железа уток [14]. Было проведено сравнение кинетики гидролиза АТФ, активации и ингибирования связывания уабанна катионами, а также субъединичного состава. Ферменты обнаруживали сходную кинетику по отношению к гидролизу АТФ и связыванию уабанна и аналогичный субъединичный состав независимо от источника их выделения. В очищенном ферменте присутствуют две субъединицы: каталитическая субъединица с молекулярной массой от 87 000 до 96 000 дальтон ( $\alpha$ ), которая фосфорилируется АТФ, и гликопротеин с молекулярной массой от 40 000 до 58 000 дальтон ( $\beta$ ) [27]. До сих пор неясно, что является рецептором уабанна — каталитическая субъединица или гликопротеин. Результаты исследований показывают, что взаимодействие очищенной АТФ-азы с антителами действительно является комплексным [23]. Кроме того, важно знать функциональную роль  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, присутствующих в молекуле. На основании количественного анализа [22], так же как и исследований по попережному сшиванию [8], можно предположить, что нативный фермент имеет состав  $\alpha_2\beta_2$ . Каталитическая субъединица, которая пронизывает мембрану, несет на себе активные центры для связывания Na, Mg-АТФ, АТФ и, возможно, K [20]. Если все Na, K-АТФ-азы содержат две одинаковые субъединицы, сродство к связыванию и таким образом кинетика активации должны быть близки у всех выделенных ферментов. Число центров связывания уабанна и центров фосфорилирования чаще всего относится как 1 : 1 [8, 27] и пропорционально

специфической активности фермента. Аналогично кинетика связывания уабаина меняется параллельно кинетике активации и ингибирования, и оптимальная концентрация  $K$  для активации гидролиза АТФ и ингибирования связывания уабаина в присутствии  $Mg$ -АТФ так же, как и природа  $Na, K$ -антагонизма, практически одинакова для всех до сих пор выделенных ферментов. Этот факт предполагает, что сродство  $Na, K$ -АТФ-азы к  $Na$  и  $K$  не зависит от источника фермента. Так как связывание должно предшествовать транспорту, можно ожидать, что сопряженные коэффициенты  $Na : K$  транспорта, измеренные в реконструированных частицах, содержащих  $Na, K$ -АТФ-азы, будут также одинаковы.

### СТЕХИОМЕТРИЯ РЕКОНСТРУИРОВАННОГО НАТРИЕВОГО НАСОСА

Сопряженные коэффициенты, наблюдаемые в фосфатидилхолиновых липосомах, содержащих  $Na, K$ -АТФ-азу из головного мозга собаки [30] и ректальной железы акулы [12] (табл. 28, А) близки

Т а б л и ц а 28. Стехиометрия сопряженного  $Na, K$  транспорта в липосомах

Источник	$Na, K$ транспорт	Ссылка
а) Мозговое вещество почки собаки, очищенное	Нет транспорта калия	[10]
Мозг собаки	3:1,8	[30]
Ректальная железа акулы	3:2,1	[12]
б) Мозговое вещество почки собаки очищенное	3:0,6	[1]
Мозговое вещество почки овцы, очищенное	3:2,3	
Мозговое вещество почки овцы, грубый экстракт	3:2,5	
Сердце быка	3:2,0	

Примечание. Липосомы содержали 10—30 мг фосфатидилхолина и 1—2 мг  $Na, K$ -АТФ-азы/мл. Коэффициент сопряжения  $Na:K$  транспорта определяли после добавления АТФ. Изотопную метку в липосомах измеряли при гельфильтрации.

к отношению  $3Na : 2K$ , которое было обнаружено в эритроцитах. В экспериментах с реконструированными липосомами, транспорт начинается в отсутствие концентрационного градиента и достигает равновесия в предельных условиях: коэффициент сопряжения при этом остается  $3Na : 2K$ . Более того, концентрация  $Na$  и  $K$  меняются таким образом, что коэффициент сопряжения остается неизменным [30]. Поэтому, видимо, сопряжение остается постоянным до тех пор, пока центры  $Na$  и  $K$  не будут насыщены. Эти данные соответствуют наблюдению, что трансмембранные градиенты в эритроцитах не обязательно влияют на коэффициент сопряжения [9]. Однако Goldin и Tong [10] при исследовании ли-

носом, содержащих Na, K-АТФ-азу из мозгового вещества почки собаки, наблюдали значительные отклонения от коэффициента порта К (табл. 28, а), но в них отмечен симпорт хлорида натрия. Goldin и Tong развили заманчивую гипотезу о том, что часть Na, Cl-«насосной» активности почечных канальцев может реконструироваться. Однако трудно согласовать их гипотезу с наблюдением, что Na, K-АТФ-аза из почек, по всей вероятности, имеет свойства, близкие к ферментам из других источников в отношении центров связывания, частичных реакций и субъединичного состава. В связи с этим представляет интерес изучение транспорта в липосомах, содержащих ферменты, выделенные в более мягких условиях из почек собаки и мозгового вещества почек овцы. Было показано [21, 22], что эти ферменты близки по чувствительности к калию и субъединичному составу (табл. 29). Методы

Таблица 29. Субъединичный состав и чувствительность к калию Na, K-АТФ-азы, применяемой для опытов по реконструкции, описанных в табл. 28, б

	Мозговое вещество почки		Сердце быка
	собака	овца	
Молекулярная масса, в дальтонах			
α	89 000	95 000	94 000
β	56 000	40 000	58 000
Процент белка	~ 100	~ 100	~ 35
Активация калием гидролиза АТФ и ингибирование калием связывания убаина	+	+	+
Ссылка	[22]	[21]	[25]

проведения реконструкции [1] аналогичны опубликованным ранее [10, 12, 17]. Фосфатидилхолин и фермент растворяли вместе в 1—2% холате и холат затем удаляли диализом против раствора 20 mM NaCl, 50 mM KCl, 70 mM холинхлорида, 5 mM MgCl<sub>2</sub> и 30 mM импдазола, рН 7,2. Присутствие холна сводит к минимуму осмотическое давление, вызываемое изменениями концентраций К и Na при транспорте. Вероятно, используемые концентрации К и Na намного превышают концентрации, необходимые для насыщения центров связывания, так что фермент всегда активируется в одной и той же степени. До измерения транспорта липосомы были уравновешены <sup>22</sup>Na и <sup>86</sup>Rb. Скорости пассивного тока Na и Rb (К) почти одинаковы, что упрощает расчет активного транспорта. Активный приток Na внутрь клетки и активный выход К наружу ингибируется добавлением 5 mM АТФ во внешнюю среду. Новое равновесие достигается через 30—40 мин после добавления АТФ и поддерживается с помощью насоса на постоянном уровне в течение по меньшей мере 3 ч.

Наличие стабильного плато подтверждает то, что активируются только внешние катионные центры, так как при активации АТФ внутренних центров ионные концентрации имеют тенденцию возвращаться к своему первоначальному уровню. Таким образом можно предположить, что либо на внутренней стороне липосом нет центров активации, либо АТФ не входит в липосомы. Так как известно, что уабани связывается с центром, который находится на противоположной по отношению к центру фосфорилирования стороне мембраны, мы попытались установить внешние и предположить наличие внутренних активных центров с помощью экспериментов по связыванию  $^3\text{H}$ -уабани в условиях, когда под действием АТФ или  $\text{P}_{\text{неорг}}$  фосфорилируются либо только внешние активные центры, либо вместе внешние и внутренние. Однако этот эксперимент не удался из-за высокого уровня неспецифического связывания уабани. Далее уабани входит в липосомы в течение 3—4 ч при  $25^\circ\text{C}$ , что усложняет исследование по связыванию. С другой стороны, это становится преимуществом при изучении центров ингибирования уабаниом активного транспорта  $\text{Na}$  и  $\text{K}$ , так как уабани может включиться в липосомы в результате простого добавления его во внешнюю среду; это исключает включение уабани в липосомы во время анализа.

В табл. 28, б приведены коэффициенты сопряжения, которые были получены нами при измерении транспорта  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$  [1]. С другой стороны, липосомы, содержащие фермент из почки собаки, проявляют определенную способность к переносу  $\text{K}$ , но соотношение  $\text{Na} : \text{K}$  равно 5 : 1. В дальнейшем мы повторили эксперименты по реконструкции с микросомальными препаратами из мозгового вещества почки овцы, обработанными  $\text{NaI}$ . Эти препараты ферментов переносят  $\text{Na}$  и  $\text{K}$  в классическом соотношении 3 : 2. Чтобы определить, является ли процесс очистки причиной потери способности к переносу  $\text{K}$ , мы приготовили липосомы с ферментом почек овцы, который был очищен тем же методом, что и препараты из почек собаки. При использовании очищенного таким образом фермента коэффициент также был равен  $3\text{Na} : 2\text{K}$ . На основании этого наблюдения можно предположить, что отсутствие транспорта  $\text{K}$  в липосомах, полученных с ферментом собак, не связано с методами очистки, если только центры  $\text{K}$  у фермента собаки не более лабильны, чем аналогичные центры у фермента овцы. Pitts и Schwartz получили образцы из сердечной мышцы быка (установлено 35% чистоты) с активностью 250—400  $\mu\text{M}$   $\text{P}_{\text{неорг}}$  на 1 мг белка в час [25]. При включении этих ферментов в липосомы активный транспорт идет в соотношении  $3\text{Na} : 2\text{K}$  (см. табл. 28, б). Видимо поэтому, за исключением липосом, полученных из фермента почек собаки,  $\text{Na}$ - и  $\text{K}$ -транспортная способность реконструированного насоса действительно одинакова. Как же можно объяснить отличающийся коэффициент сопряжения, наблюдаемый в липосомах, содержащих  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФ-азу из почек собаки? Увеличение коэффициента может быть обусловлено либо ростом транспорта  $\text{Na}$ , либо снижением транспорта  $\text{K}$ . Срав-



ленно количества Na и K, переносимых липосомами, содержащими ферменты из почек собаки и овцы приблизительно одной активности, показывает, что в липосомах, содержащих фермент из почек собаки, количество переносимого натрия в липосомы больше, чем для фермента из почек овцы, тогда как транспорт K значительно снижен [1]. Jørgensen [15] недавно опубликовал важное исследование по инактивации трипсином Na, K-АТФ-азы в присутствии Na или K, где он пришел к заключению, что  $\alpha$ -субъединица с молекулярной массой 100 000 дальтон может состоять из разных K- и Na-переносящих составных частей. Таким образом, различия в коэффициенте переноса Na, K можно рационально объяснить, предположив различное соотношение Na- и K-переносящих субъединиц. Интересно распространить этот вывод и дальше, предположив, что Na, K-АТФ-аза из почечных канальцев может быть загрязнена дополнительными Na- или Cl-переносящими субъединицами в очищенных, на первый взгляд, препаратах. Sweadlow и Goldin [30] предположили, что в почечной Na, K-АТФ-азе Na, Cl симпорт заменяет Na, K антипорт. Таким образом, K-переносящие ферменты не будут способны к переносу Cl. Эта точка зрения нуждается в подтверждении для лучшего понимания связи между субъединичным составом и транспортной способностью.

По второй гипотезе более специфическая роль в отношении транспорта калия отдается гликопротеиновой субъединице. Так как, видимо, гликопротеин локализован на внешней стороне мембраны [19] и существует тесная функциональная связь между центрами связывания убаина и калия, локализованных на внешней стороне мембраны, интересно предположить, что гликопротеин может непосредственно включаться в транспорт калия. В этом случае жесткое сопряжение транспорта Na : K может объясняться в той же мере жестким соотношением каталитический белок : гликопротеин. В действительности одна молекула фермента может состоять из двух  $\alpha$ - и двух  $\beta$ -субъединиц, т. е.  $\alpha : \beta = 1 : 1$  [22]. Очевидно, более подробное изучение отношения  $\alpha : \beta$  в почечных ферментах покажет, что возможны некоторые отклонения от соотношения 1 : 1.

Недавно Racker и Fisher [26] обсуждали роль факторов сопряжения в активных процессах транспорта, и их концепция может быть третьим объяснением непостоянства соотношений сопряжения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anner B. M., Lane L. K., Schwartz A., Pitts B. J. R. A reconstituted (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) pump in liposomes containing purified (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase from kidney medulla. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 467, 340—345.
2. Baker P. F. Phosphorus metabolism of intact crab nerve and its relation to the active transport of ions. — *J. Physiol.*, 1965, 180, 383—423.
3. Baker P. F., Willis J. S. Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells. — *J. Physiol.*, 1972, 224, 441—442.

4. *Bonting S. L., Caravaggio L. L.* Studies on Na: K activated ATPase. V. Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 101, 37—46.
5. *Dydyńska M., Harris E. J.* Consumption of high-energy phosphates during active Na and K interchange in frog muscle. — *J. Physiol.*, 1966, 182, 92—109.
6. *Garrahan P. J., Glynn I. M.* The stoichiometry of the sodium pump. — *J. Physiol.*, 1967, 192, 217—235.
7. *Giebisch G.* Coupled ion and fluid transport in the kidney. — *N. Engl. J. Med.*, 1972, 287, 913—919.
8. *Giotta G. J.* Quaternary structure of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-dependent adenosine triphosphatase. — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 1247—1252.
9. *Glynn I. M., Karlisch S. J. D.* The sodium pump. — *Annu. Rev. Physiol.*, 1975, 37, 13—55.
10. *Goldin S. M., Tong S. W.* Reconstitution of active transport catalyzed by the purified sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase from canine renal medulla. — *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 5907—5915.
11. *Grisham C. M., Barnett R. E.* The interrelationship of membrane and protein structure in the functioning of Na, K-ATPase. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 266, 613—618.
12. *Hilden S., Hokin L. E.* Active potassium transport coupled to active sodium transport in vesicles reconstituted from purified sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from the rectal gland of *Squalus acanthias*. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 6296—6303.
13. *Hokin L. E., Dahl J. L., Deupree J. D., Dixon J. F., Hackney J. F., Perdue J. F.* Studies on the characterization of Na, K-ATPase. X. Purification of the enzyme from rectal gland of *Squalus acanthias*. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 2593—2605.
14. *Hopkins B. E., Wagner H., Smith T. W.* Sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase of the nasal gland of the duck (*Anas platyrhynchos*). — *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 4365—4371.
15. *Jørgensen P. L.* Purification and characterization of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 466, 97—108.
16. *Jørgensen P. L., Skou J. C., Solomonson L. P.* Preparation by zonal centrifugation of highly active Na, K-ATPase from the outer medulla of rabbit kidney. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 233, 366—371.
17. *Kagawa Y., Racker E.* Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing <sup>32</sup>Pi-adenosine triphosphatase exchange. — *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 5477—5487.
18. *Kyte J.* Purification of Na, K-ATPase from canine renal medulla. — *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 4157—4165.
19. *Kyte J.* Properties of the two polypeptides of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. — *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 7642—7649.
20. *Kyte J.* Structural studies of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. The relationship between molecular structure and the mechanism of active transport. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 7443—7449.
21. *Lane L. K., Anner B. M., Wallick E. T., Ray M. V., Schwartz A.* Effect of phospholipase A treatment on the partial reactions of and ouabain binding to a purified sodium and potassium activated adenosine triphosphatase. — *Biochem. Pharmacol.*, 1978, 27, 225—231.
22. *Lane L. K., Copenhaver J. H., Jr., Lindenmayer G. E., Schwartz A.* Purification and characterization of and <sup>3</sup>H-ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. — *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 7197—7200.
23. *Michael L., Wallick E. T., Schwartz A.* Modification of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase function by a purified antibody to the holoenzyme: Effects of enzyme activity and <sup>3</sup>H ouabain binding. — *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 8476—8480.
24. *Nakao T., Nakao M., Mizuno N., Kamatsu Y., Fujita M.* Purification and some properties of Na, K-ATPase. I. Solubilization and stability of Lubrol extracts. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1973, 73, 609—619.

25. Pitts B. J. R., Schwartz A. Improved purification and partial characterization of  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$  from cardiac muscle. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 401, 186—195.
26. Racker E., Fisher L. W. Reconstitution of an ATP-dependent sodium pump with an ATPase from electrical eel and pure phospholipids. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 67, 1144—1150.
27. Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C. The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. — *Pharmacol. Rev.*, 1975, 27, 3—111.
28. Sen A. K., Post R. L. Stoichiometry and localization of ATP dependent Na and K transport in the erythrocyte. — *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 345—352.
29. Skou J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 23, 394—401.
30. Sweadner K. J., Goldin S. M. Reconstitution of active ion transport by the sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase from canine brain. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 4022—4024.
31. Whittam R., Agar M. E. The connexion between active transport and metabolism in erythrocytes. — *Biochem. J.*, 1965, 97, 214—227.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМИЛОРИДА В КАЧЕСТВЕ ПРОБЫ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ТРАНСПОРТА И МЕТАБОЛИЗМА НАТРИЯ В МОЧЕВОМ ПУЗЫРЕ ЖАБЫ

МИТЦИ КАНЕССА, ПЕДРО ЛАБАРКА, АЛЕКСАНДР ЛИФ  
(MITZY CANESSA, PEDRO LABARCA, ALEXANDER LEAF)

*Отделения медицины и физиологии, Массачусетский госпиталь  
и Гарвардская школа медицины, Бостон, Массачусетс 02114, США*

Амилорид, пиперазинный диуретик (3,5-диампио-6-хлорпиперазин-пол-гуанидин·HCl), представляет собой мощный ингибитор транспорта натрия через изолированный мочевой пузырь жабы *Bufo marinus* [1, 6, 15]. Ингибирование транспорта натрия в слизистой среде становится заметным при концентрации амилорида  $10^{-7}$  М и полным при  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  М. Эти концентрации амилорида не вызывают ингибирования в серозной среде. Эффект проявляется в течение нескольких секунд после добавления соединения в слизистую среду, однако он обратим; соединение легко вымывается со слизистой поверхности. Результаты показывают, что амилорид блокирует прохождение натрия через слизистую поверхность транспортирующих клеток. Амилорид не оказывает влияния на механизм вазолатерального транспорта слизистых клеток. Амфотерицин Б — реагент, который неспецифически увеличивает проницаемость слизистой поверхности, снимает ингибирование транспорта натрия под действием амилорида, тем самым указывая на то, что базолатеральные центры натриевого насоса не ингибируются этим лекарством.

Учитывая данные о блокирующем действии амилорида только на путь активного транспорта натрия в пузыре жабы, мы использовали этот фармакологический эффект для изучения трех важных аспектов транспорта натрия: возможное повторное циркулирование натрия из серозной среды через апикальные поверхности в слизистые клетки и его последующее активное вытеснение из

клеток обратном в серозную среду; б) вклад активного транспорта натрия через пузырь; в) связь  $E_{Na}$  (электродвижущая сила натриевого насоса) с трансэпителиальным потенциалом,  $\Delta\psi$ .

### РЕЦИКУЛЯЦИЯ СЕРОЗНОГО НАТРИЯ

Слизистые и базолатеральные плазматические мембраны однослойных слизистых клеток эпителия, выстилающих внутреннюю поверхность мочевого пузыря жабы, представляют собой двойной барьер, через который активно переносятся ионы натрия [5]. Ионы натрия движутся из слизистой среды через апикальную или слизистую плазматическую мембрану в эпителиальные клетки в сторону снижения градиента электрохимического потенциала. В клетке ионы натрия присутствуют в низких концентрациях [11] внутри «активных транспортных пулов». Вытеснение натрия из клетки в серозную среду требует движения ионов натрия в сторону роста градиента электрохимического потенциала, и для этой стадии трансэпителиального транспорта требуется совершить определенную работу. Не получено ответа на вопрос, может ли натрий из серозной среды диффундировать обратно в клетку, попадая в пул активного транспорта натрия слизистой природы, и затем активно переноситься обратно в серозную среду.

Подобная рециркуляция серозного натрия энергетически невыгодна и вряд ли играет полезную роль в мочевом пузыре. До последнего времени было трудно адресовать этот вопрос экспериментаторам, так как кинетические методы исследования проницаемости двух сторон эпителиальных клеток не дали удовлетворительных результатов. В настоящем исследовании мы использовали для ответа на вопрос измерение скорости метаболизма в мочевом пузыре.

Одновременно мы провели измерение суммарного транспорта натрия (ток короткого замыкания) и количества  $CO_2$ , выработанного клеткой [12] в присутствии или в отсутствие натрия в серозной среде, и рассчитали скорость транспорта ионов натрия по отношению к молекулам  $CO_2$ , вырабатываемым клеткой [2]. В соответствии с моделью повторное циркулирование натрия через серозный барьер проницаемости требует затраты метаболической энергии, так как ионы натрия, входящие в активный транспортный пул слизистых клеток, неотличимы от ионов слизистой среды. Однако такие ионы натрия не вносят вклад в суммарный транспорт натрия,  $I_{Na}$ . Удалением натрия из серозной среды можно остановить повторное циркулирование серозного натрия и тем самым уменьшить выработку  $CO_2$  без изменения  $I_{Na}$  и тогда отношение  $I_{Na}$  к  $I_{CO_2}$  будет возрастать. С другой стороны, если отношение не меняется при удалении серозного натрия, можно сделать вывод, что существенного притока серозного натрия в «активный транспортный пул» не происходит — базолатеральная плазматическая мембрана в основном непроницаема для натрия, кроме пути активного транспорта.

Для того чтобы провести такого рода эксперименты, надо прежде всего найти способ разложения суммарного  $\text{CO}_2$  ( $I_{\text{CO}_2}$ ) на базальную ( $I_{\text{CO}_2}^b$ ) и супрабазальную ( $I_{\text{CO}_2}^{cb}$ ) составляющие. Выработка базального  $\text{CO}_2$  является мерой метаболизма, который не связан с активным транспортом натрия, т. е. остаточная выработка  $\text{CO}_2$  имеет место в отсутствие трансэпителиального транспорта натрия  $I_{\text{Na}}=0$ . Выработка супрабазального  $\text{CO}_2$ ,  $I_{\text{CO}_2}^{cb}$ , относится к тому  $\text{CO}_2$ , который удовлетворяет энергетическим требованиям активного транспорта натрия. Поэтому нас интересует в основном соотношение  $I_{\text{Na}}/I_{\text{CO}_2}^{cb}$ .

Разложения  $I_{\text{CO}_2}$  на  $I_{\text{CO}_2}^b$  и  $I_{\text{CO}_2}^{cb}$  можно достичь двумя методами. Во-первых, весь натрий в слизистой среде заменяли на ионы холина или магния. В отсутствие слизистой натрия трансэпителиальный транспорт натрия не может иметь места, т. е.  $I_{\text{Na}}=0$ . Таким образом, весь  $\text{CO}_2$  в этом случае должен быть базальным,  $I_{\text{CO}_2}^b$ . Во-вторых, наоборот, при добавлении  $10^{-4}$  М аммония к слизистой среде происходит блокирование всего трансэпителиального транспорта натрия и измеряется остаточный, или базальный  $\text{CO}_2$ ,  $I_{\text{CO}_2}^b$ . Последний метод является предпочтительным, так как он дает возможность проводить измерения без создания химического градиента через ткань.

В табл. 30 показано влияние замены серозного натрия холи-

Таблица 30. Влияние серозной среды, не содержащей натрия, на отношение  $I_{\text{Na}}/I_{\text{CO}_2}^{cb}$  в мочевом пузыре жабы

Период Серозная среда		$I_{\text{Na}}/I_{\text{CO}_2}^{cb}$		
		$\overset{2}{\text{Na}}$	$\overset{2}{\text{холин}}$	$\overset{3}{\text{Na}}$
А (n=6)	$\bar{X}$	20,7	23,0	25,5
	$\pm\text{SEM}$	2,7	3,6	5,5
Б (n=7)	$\bar{X}$	11,5	15,5	16,8
	$\pm\text{SEM}$	2,5	3,3	3,3
В (n=6)	$\bar{X}$	7,4	9,4	8,9
	$\pm\text{SEM}$	1,7	0,9	1,8

Примечание. В качестве слизистой среды во всех экспериментах использовали раствор Рингера с натрием.

ном на соотношение  $I_{\text{Na}}/I_{\text{CO}_2}^{cb}$ . Последовательность изменений серозной среды варьирует в опытах А, Б, В, так как механические эффекты изменений в среде сами по себе влияют на это отношение. Однако очевидно, что присутствие или отсутствие серозного натрия не оказывает на него существенного влияния.

В связи с различием результатов, приведенных в табл. 30, мы использовали также другую схему опыта. К слизистой среде добавляли 0,1 мМ амилорида. Измеряли выработку базального  $\text{CO}_2$  и затем заменяли натриевый раствор Рингера, омывающий серозную поверхность, не содержащим натрия раствором Рингера с магнием или холином и в дальнейшем измеряли уже  $I_{\text{CO}_2}^6$ . Если имеет место повторная циркуляция натрия через серозную оболочку, это потребует метаболического вклада в  $I_{\text{CO}_2}^6$ . В табл. 31 по-

Таблица 31. Влияние замены холином или магнием серозной среды на выработку базального  $\text{CO}_2$  ( $I_{\text{CO}_2}^6$  при  $I_{\text{Na}} = 0$  в мочевом пузыре жабы

	Период		
	1	2	3
А	Na $1,7 \pm 0,4$	Холин $1,5 \pm 0,4$	Na (серозная среда) $1,4 \pm 0,4$ (n=6)
Б	Na $1,7 \pm 0,4$	Mg $1,4 \pm 0,3$	Na $1,4 \pm 0,4$ (n=7)
В	Na $2,2 \pm 0,2$	Холин $2,2 \pm 0,2$	Холин $2,2 \pm 0,2$ (n=4)

Примечание. Средние значения величины  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  приведены в наномолях (миллиграммы сухой массы) $^{-1}$  (мин) $^{-1}$ . В опытах А и Б для поддержания  $I_{\text{Na}} = 0$  в серозную среду добавляли 0,1 мМ амилорида; в опыте В для поддержания  $I_{\text{Na}} = 0$  использовали раствор Рингера с холином, но без натрия; в периоде 3 опыта В в слизистую среду добавляли также 0,1 мМ амилорида.

казано, что  $I_{\text{CO}_2}^6$  не зависит от присутствия натрия в серозной среде. Эти данные еще раз подтверждают, что незначительное количество Na получает доступ к внутриклеточному «пулу активного транспорта», если это вообще имеет место.

Мы можем заключить, что базолатеральные плазматические мембраны транспортирующего слоя эпителиальных клеток в пузыре жабы в основном непроницаемы для натрия по всем путям, кроме активного натриевого насоса. Это заключение подтверждается исследованиями, проведенными с разными концентрациями натрия внутри транспортирующего слоя слизистых клеток с использованием электронных микропроб. Внутриклеточные концентрации натрия оказались низкими — около 13 мМ/л и не зависят от присутствия натрия в серозной среде [13а].

### МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ЦЕНА ТРАНСПОРТА НАТРИЯ

Нами была предпринята проверка возможного сопряжения транспорта натрия с метаболизмом [8]. Были проведены одновременные измерения выработки  $\text{CO}_2$ , которая зависит от транспорта натрия, и скорости транспорта натрия. Во время измерения транспорта натрия через «путь активного транспорта» вместе со скоростью выработки супрабазального  $\text{CO}_2$  трансэпителиальный электрический потенциал изменялся от +50 до -50 мВ. При до-

стижении стационарного состояния транспортной активности и выработки  $\text{CO}_2$  метаболическая цена транспорта натрия оказалась такой же, как если бы мочевой пузырь расходовал энергию на движение натрия против электрического градиента  $+50$  мВ или натрий двигался бы под действием градиента отрицательного электрического потенциала через «активный транспортный путь» пузыря. В обоих случаях число ионов натрия, проходящих по активному транспортному пути,  $I_{\text{Na}}$ , и одновременная супрабазальная скорость выработки  $\text{CO}_2$  были таковы, что соотношение  $I_{\text{Na}}/I_{\text{CO}_2}^{\text{сб}}$  осталось постоянным.

В наших исследованиях мы получили преимущество, используя действие амилорида как блокатора поступления натрия в активный транспортный путь слизистого слоя клеток. Были проведены измерения электрического тока  $I_t$  через пузырь при разных значениях трансэпителиального электрического потенциала,  $\Delta\psi$ . Затем к слизистой среде добавляли  $0,1$  мМ амилорида и вновь определяли электрический ток для тех же значений  $\Delta\psi$ . При блокировании амилоридом активного транспорта этот остаточный ток  $I_p$ , как можно предположить, для движения ионов через пузырь связан с проводимостью по пассивным путям [7, 13]. Электрический ток, текущий по активному пути, как было потом установлено, равен  $I_a = I_t - I_p$ .

При одновременном измерении  $\text{CO}_2$  метаболизм, связанный с активным транспортом натрия, определяли как общий  $\text{CO}_2$ , вырабатываемый тканью, минус базальный  $\text{CO}_2$ , полученный в присутствии амилорида:

$$I_{\text{CO}_2}^{\text{сб}} = I_{\text{CO}_2} - I_{\text{CO}_2}^{\text{б}}$$

Для того чтобы подтвердить правильность такой оценки выработки супрабазального  $\text{CO}_2$ , было важно определить, влияет ли на базальный  $\text{CO}_2$  трансэпителиальный потенциал,  $\Delta\psi$ . В присутствии  $0,1$  мМ амилорида базальный  $\text{CO}_2$  был измерен через последовательные промежутки времени, равные  $15$  мин при  $\Delta\psi = 0, +50$  и  $-50$  мВ. Соответствующие значения выработки базального  $\text{CO}_2$  составили  $0,85 \pm 0,11$ ;  $0,84 \pm 0,11$  и  $0,84 \pm 0,11$  нмоль/мл сухой массы в минуту ( $X \pm \text{SEM}$ ) соответственно в 17 экспериментах. Таким образом в исследованных пределах скорость выработки базального  $\text{CO}_2$  не зависит от  $\Delta\psi$ .

Необходимо было выяснить, будет ли пассивная ионная проводимость зависеть от  $\Delta\psi$ . В 19 опытах трансэпителиальная пассивная проводимость уменьшалась на  $60\%$  в присутствии  $0,1$  мМ амилорида и ее значения не изменялись при  $\Delta\psi = 0, +50, -50$  мВ и составляли в среднем  $0,81 \pm 0,1$ ;  $0,88 \pm 0,1$ ;  $0,84 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$  ( $\text{см}^2$ ) $^{-1}$  соответственно.

Первоначальные наблюдения указывают на то, что резкие изменения в  $\Delta\psi$  часто вызывают большие, зависящие от времени изменения в ионном транспорте и выработке  $\text{CO}_2$ , продолжающиеся  $20$  мин. Измерение метаболической цены транспорта натрия в этот период может привести к ошибочным результатам.

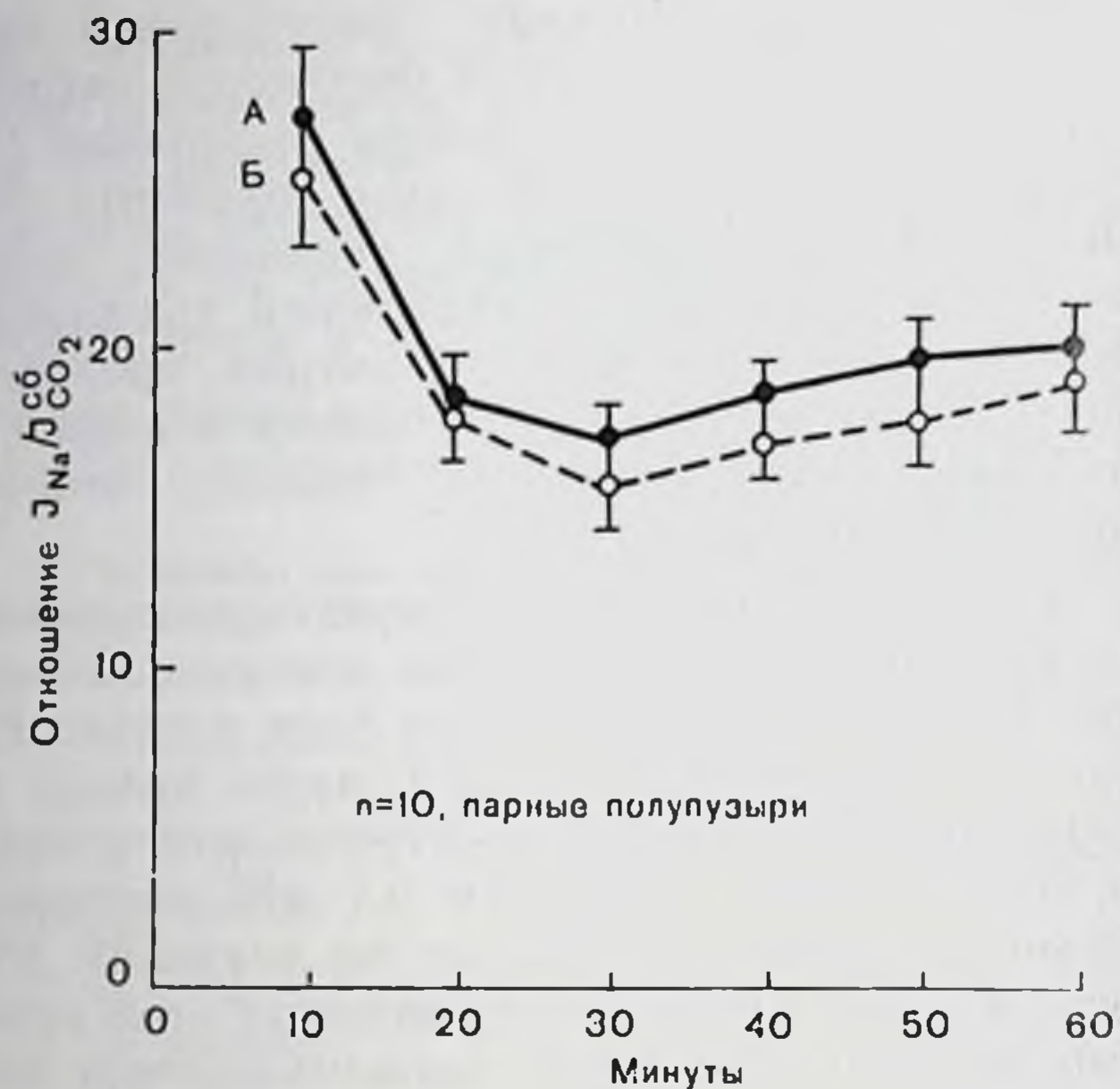


Рис. 137. Отношение  $I_{Na}/I_{CO_2}^{сб}$  при  $\Delta\psi = 0$  в течение 60 мин в парных полупузырях А и Б. Видно хорошее совпадение отношений в спаренных полупузырях и постоянство отношения от 20 до 60 мин опыта [8].

На рис. 137 показано соотношение  $I_{Na}/I_{CO_2}^{сб}$  в течение первого часа в парных полупузырях, где ткани поддерживают ток короткого замыкания ( $\Delta\psi = 0$ ). После сильного уменьшения соотношения значения остаются постоянными в пределах 20—60 мин.

Зная, что в этих исследованиях парные полупузыри дают сходную реакцию, мы производили измерение отношения, выдерживая одну половину при  $\Delta\psi = +50$  мВ, а другую — при  $\Delta\psi = -50$  мВ в течение 60 мин. После наблюдения в течение первых 60 мин меняли знак трансэпителиальных потенциалов и проводили измерения еще в течение 60 мин. При  $\Delta\psi = -50$  мВ в первые 10 мин наблюдения были получены аномальные значения. В интервале 20—60 мин отношения практически оставались постоянными, так же как существенно не отличались друг от друга значения при  $\Delta\psi = +50$  мВ и  $\Delta\psi = -50$  мВ. Отсутствие изменений в соотношении  $I_{Na}/I_{CO_2}^{сб}$  при  $\Delta\psi = +50$  мВ по сравнению с  $\Delta\psi = -50$  мВ должно наблюдаться в случае, когда изменения в трансэпителиальном потенциале не влияют на трансэпителиальный транспорт натрия,  $I_{Na}$ . Однако при  $\Delta\psi = +50$  мВ  $I_{Na} = 139 \pm 28$  и  $I_{CO_2}^{сб} = 7,3 \pm 1,6$ , тогда как при  $\Delta\psi = -50$  мВ  $I_{Na} = 270 \pm 35$  и  $I_{CO_2}^{сб} = 12,6 = 12,6 \pm 1,4$  имоль на 1 мг сухой массы в час.

Таким образом, изменения в  $\Delta\psi$  не влияют на  $I_{Na}$ , но  $I_{CO_2}^{сб}$



изменяется таким образом, что их соотношение остается постоянным.

Так как движение ионов натрия по пути «активного транспорта» в слизистых клетках требует источника метаболической энергии, который не зависит от направления движения натрия по отношению к электрическому потенциалу, интересно выяснить, смогут ли ионы натрия двигаться «вниз» по пути «активного транспорта», если метаболическая энергия не присутствует в натриевом насосе. Na, K-АТФ-азу мочевого пузыря блокировали уабанном и таким образом исключали возможность использования энергии АТФ натриевым насосом. В присутствии  $10^{-2}$  М уабанна в серозной среде и при  $\Delta\psi = -50$  мВ  $I_{Na}$  падает до нуля или очень незначительных величин. Последующее добавление амилорида (0,1 мМ) не влияет на  $I_{Na}$  или  $I_{CO_2}$  в двух опытах и незначительно уменьшает их в третьем опыте. На основании этих данных можно предположить, что ингибирование гидролиза АТФ в натриевом насосе приводит к закрытию активного пути для движения натрия даже тогда, когда отрицательный электрический потенциал благоприятствует такому движению через эпителий.

Среднее значение для количества переносимых ионов натрия на одну молекулу  $CO_2$  [18—20], полученное в наших экспериментах, близко к найденному ранее Zerahn [18], Leat и Renshaw [9], которые изучали транспорт натрия и потребление кислорода кожей лягушки.

Полное сопряжение транспорта натрия и запаса метаболической энергии было продемонстрировано на примере постоянства соотношения  $I_{Na}/I_{CO_2}^{cb}$  во всем изученном интервале  $\Delta\psi$ . Очевидна необходимость затрат метаболической энергии в том случае, когда  $I_{Na}$  направлен против  $\Delta\psi = +50$  мВ. Расход близкого количества энергии, когда натрий идет «вниз» по транспортному пути при внешнем электрическом градиенте, является неизбежным следствием полного сопряжения транспорта натрия и метаболизма. При фиксированном сопряжении, но меньшем количестве энергии, необходимой для транспорта «вниз» по сравнению с энергией, необходимой для транспорта «вверх», большее количество свободной энергии ретранспортом «вверх», большее количество свободной энергии ретранспортом «вверх», большее количество свободной энергии ретранспортом «вверх» будет рассеиваться в виде тепла. Действительно, с увеличением тока натрия во время транспорта «вниз» генерируется больше тепла. Вероятно, в этом случае образующаяся от гидролиза АТФ свободная энергия не требуется для активного транспорта натрия.

АТФ может быть необходим для регулирования скорости движения натрия по пути насоса, если число ионов натрия, которые могут переноситься на одну гидролизованную молекулу АТФ, фиксировано для всего изученного интервала  $\Delta\psi$ . Если общий транспорт натрия может происходить против более высоких потенциалов, чем  $+50$  мВ, то стехиометрическое соотношение может уменьшиться.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ $E_{Na}$ И $\Delta\psi$

С помощью амилорида можно разделить общий электрический ток и проводимость через мочевой пузырь жабы на «активный» и «пассивный» компоненты. Yonath и Civan [17] представили  $E_{Na}$  как:

$$E_{Na} = \frac{F_{I_{Na}}}{G_a} + \Delta\psi,$$

где  $F_{I_{Na}}$  — электрический ток, связанный с транспортом натрия по активному пути, т. е. трансэпителиальный электрический ток, который блокируется амилоридом при всех значениях  $\Delta\psi$ ;  $G_a$  — трансэпителиальная проводимость, уничтожаемая амилоридом;  $\Delta\psi$  — трансэпителиальный электрический потенциал. Таким образом, из данных, полученных в описанных выше экспериментах, мы можем установить значение  $E_{Na}$  по этой формуле. Как видно из табл. 32, значение  $E_{Na}$  при  $\Delta\psi = +50$  мВ значительно выше,

Таблица 32. Действие  $\Delta\psi$  на  $E_{Na}$  в парных полупузырях в течение 1 ч

$\Delta\psi$ , мВ	$I_{Na}$ , пмоль (на 1 мг сухой массы) <sup>-1</sup> (мин) <sup>-1</sup>	$E_{Na}$ , мВ
+50	$3,9 \pm 0,4$	$158 \pm 7,0$ (n=7)
-50	$9,1 \pm 1,0$	$106 \pm 5,3$ (n=8)

чем  $E_{Na}$  при  $\Delta\psi = -50$  мВ. Эту зависимость наблюдали в парных полупузырях в течение 60 мин при  $\Delta\psi$  либо  $-50$  мВ, либо  $+50$  мВ. Аналогичные наблюдения были сделаны в опытах (рис. 138), когда те же полупузыри в течение 60 мин подвергали действию сначала  $\Delta\psi = +50$  мВ, а затем  $-50$  мВ или наоборот (в среднем  $161 \pm 15$  и  $85 \pm 2$  мВ при  $\Delta\psi = +50$  и  $-50$  мВ соответственно).

Изменение  $E_{Na}$  в зависимости от  $\Delta\psi$  в одной и той же ткани или парных полупузырях является неожиданным, если предположить, что  $E_{Na}$  должна быть характеристической константой натриевого насоса. Однако величину  $E_{Na}$  надо рассматривать более широко. Даже если натриевый насос представить как электрическую батарею, невозможно установить электродвижущую силу батареи по току, который течет из нее. Для измерения электродвижущей силы необходимо использовать вольтметр с очень большим сопротивлением.

Натриевый насос мочевого пузыря жабы напоминает электрическую батарею, по крайней мере в том плане, что электродвижущая сила натриевого насоса,  $E_{Na}$ , уменьшается с ростом тока натрия через насос. Ussing и Zerahn [16] предложили рассматривать  $E_{Na}$  как максимальный электрический потенциал, который может генерировать система активного транспорта в коже лягуш-

ки. Они попытались определить  $E_{Na}$  как гиперполяризующий потенциал через кожу лягушки, который как раз превращает одноподirectionalный поток натрия через кожу в два эквивалентных потока в разных направлениях. В то время гипотеза шунтирования путей через кожу не была оценена по достоинству. Однако его существование означает, что общий транспорт натрия через насос может продолжаться, несмотря на эквивалентный ток натрия в двух направлениях, что лишает смысла описанный выше метод определения  $E_{Na}$ .

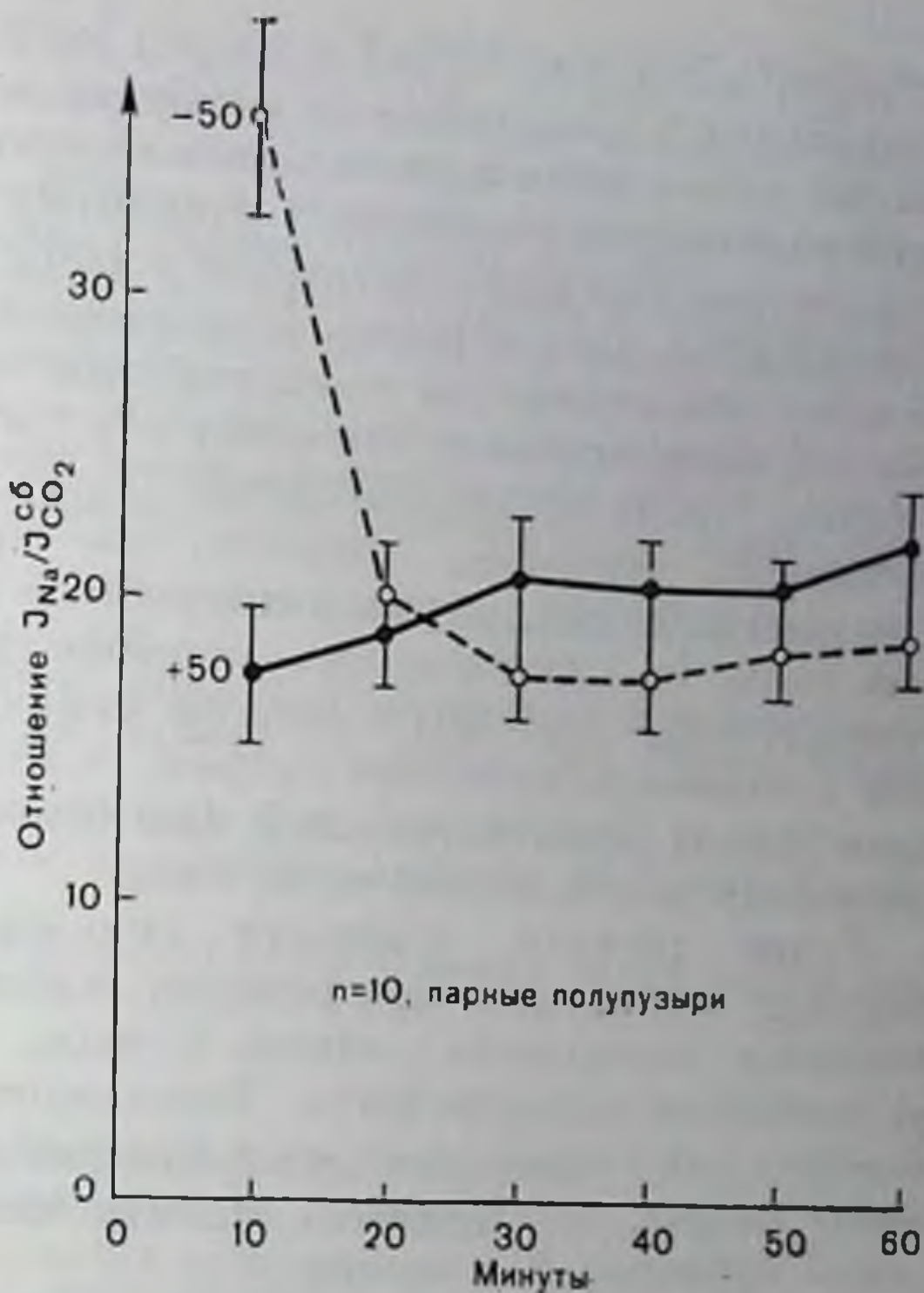


Рис. 138. Отношения  $I_{Na}/I_{CO_2}^{cb}$  в течение двух 60-минутных периодов в парных полупузырях, одна половина которых выдерживалась сначала при +50 мВ, а затем при -50 мВ, тогда как другая подвергалась действию трансэпителиального потенциала в обратном порядке. Постоянные значения получены после 20 мин [8].

В других методах определения  $E_{Na}$  ток в системе исключается или сводится к минимуму [3, 4] и значение  $E_{Na}$  больше значений, полученных Yonath и Civan [17], Hong и Essig [73]. Предполагая линейную зависимость  $E_{Na}$  от  $I_{Na}$ ,  $E_{Na}$  можно определить экстраполяцией  $I_{Na}$  к нулю по данным табл. 32. Значение  $E_{Na}$  в этом случае 197 мВ. Если, действительно, в течение эксперимента нет транспорта натрия по пути натриевого насоса, это значение  $E_{Na}$  можно считать истинным. Однако недостаточно знать, что  $E_{Na}$  была определена в отсутствие внешнего тока, текущего из пузыря. Натрий, диффундирующий из серозной среды в эпителиальные клетки, может повторно циркулировать через насос и, таким образом, насос останется активным независимо от наличия общего трансэпителиального транспорта. Однако ранее на примере тока короткого замыкания в мочевом пузыре было показано, что базолатеральные плазматические мембраны непроницаемы для серозного натрия, так что эта возможность маловероятна.

Движение ионов калия из серозной среды в клетки также может шунтировать активность натриевого насоса. Для этого необходима либо постоянная аккумуляция калия клетками, либо поглощение ионов калия с одновременной потерей калия анионом,

например хлоридом. Калий и хлорид могут проходить через базолатеральную плазматическую мембрану в основном пассивно. Но так как наблюдения проводились в течение 2 ч и дольше, похоже, что стационарное состояние в отношении внутриклеточного ионного состава уже было достигнуто и такой обмен натрия на калий маловероятен, хотя обратное и не доказано. Слизистые или луминальные плазматические мембраны, как было показано Macknight [10, 14], непроницаемы для ионов как хлора, так и калия. Таким образом, наше трансполирование  $I_{Na}$  к нулю, если линейность существует, возможно, означает, что через натриевый насос не идет «чистый» ток натрия и полученное значение электродвижущей силы,  $E_{Na}$ , истинно. Это значение должно также отражать отрицательную свободную энергию химической реакции, приводящей в движение транспорт натрия, — будет существовать равновесие между прямой реакцией (расщепление АТФ) и обратным движением ионов натрия через насос.

Таким образом, используя уникальное фармакологическое свойство амилорида специфически блокировать вход натрия на внешнюю поверхность клеток пузыря, можно показать, что: а) пассивная проницаемость базолатеральных плазматических мембран для натрия очень мала или вообще отсутствует; б) число ионов натрия, переносимых на одну молекулу  $CO_2$ , постоянно и равно примерно 20 в интервале от  $\Delta\psi = +50$  до  $-50$  мВ; в) электродвижущая сила натриевого насоса,  $E_{Na}$ , больше при  $\Delta\psi = +50$  мВ, чем при  $\Delta\psi = -50$  мВ. Это различие в  $E_{Na}$  может, по меньшей мере отчасти, быть следствием попыток определить электродвижущую силу натриевого насоса при  $I_{Na} > 0$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bentley P. J. Amiloride: A potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. — *J. Physiol.*, 1969, 195, 317—330.
2. Canessa M., Labarca P., Leaf A. Metabolic evidence that serosal sodium does not recycle through the active transepithelial transport pathway of toad bladder. — *J. Membr. Biol.*, 1976, 30, 65—77.
3. Civan M. M. Effects of active sodium transport on current-voltage relationships of toad bladder. — *Am. J. Physiol.*, 1970, 219, 235—245.
4. Civan M. M., Kedem O., Leaf A. Effect of vasopressin on toad bladder under conditions of zero net sodium transport. — *Am. J. Physiol.*, 1966, 211, 569—575.
5. DiBona D. R., Civan M. M., Leaf A. The anatomic site of the transepithelial permeability barriers of toad bladder. — *J. Cell. Biol.*, 1969, 40, 1—7.
6. Ehrlich E. N., Crabbe J. The mechanism of action of amipramizide. — *Pflügers. Arch.*, 1968, 302, 79—96.
7. Hong C. D., Essig A. Effects of 2 deoxy-D-glucose amiloride, vasopressin, and ouabain on active conductance and  $E_{Na}$  in the toad bladder. — *J. Membr. Biol.*, 1976, 28, 121—142.
8. Labarca P., Canessa M., Leaf A. Metabolic cost of sodium transport in toad bladder. — *J. Membr. Biol.*, 1977, 32, 383—401.
9. Leaf A., Renshaw A. Ion transport and respiration of isolated frog skin. — *Biochem. J.*, 1957, 65, 82—90.
10. Macknight A. D. C. The contribution of mucosal chloride to chloride in toad bladder epithelial cells. — *J. Membr. Biol.*, 1977 (in press).

11. Macknight A. D. C., Civan M. M., Leaf A. The sodium transport pool in toad urinary bladder epithelial cells. — *J. Membr. Biol.*, 1975, 20, 365—386.
12. Maffly R. H. A conductometric method for measuring micromolar quantities of carbon dioxide. — *Anal. Biochem.*, 1968, 23, 252—262.
13. O'Neil R. G., Helman S. I. Influence of vasopressin and amiloride on shunt pathways of frog skin. — *Am. J. Physiol.*, 1976, 231, 164—173.
14. Rick H., Dörge A., Macknight A. D. C., Leaf A., Thurán K. Electron microprobe analysis of the different epithelial cells of toad urinary bladder. — *J. Membrane Biol.*, 1978, 39, 257—271.
15. Robinson B. A., Macknight A. D. C. Relationships between serosal medium potassium concentration and sodium transport in toad urinary bladder. III. Exchangeability of epithelial cellular potassium. — *J. Membr. Biol.*, 1976, 26, 269—286.
16. Sudou K., Hoschi T. Mode of action of amiloride in toad urinary bladder. — *J. Membr. Biol.*, 1977, 32, 115—132.
17. Ussing H. H., Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. — *Acta Physiol. Scand.*, 1951, 23, 110—127.
18. Yonath J., Civan M. M. Determination of the driving force of the Na<sup>+</sup> pump in toad bladder by means of vasopressin. — *J. Membr. Biol.*, 1971, 5, 366—385.
19. Zerahn K. Oxygen consumption and active transport in the isolated and short-circuited frog skin. — *Acta Physiol. Scand.*, 1956, 36, 300—318.

### ДЕЙСТВИЕ АМИЛОРИДА НА ФУНКЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕФРОНА

ДЖ. ГЕЙБИШ  
(G. GIEBISCH)

*Отделение физиологии, Школа медицины Йельского университета,  
Нью-Хейвен, Коннектикут 06510, США*

Эпителий мочевого пузыря жабы обладает многими транспортными свойствами, общими с периферическим сосудистым эпителием, и многие проблемы переноса натрия, воды и неэлектролитов, так же как и молекулярный механизм действия антидиуретического гормона и альдостерона, были выяснены при тщательном изучении *in vitro* эпителия мочевого пузыря жабы. Однако в одном важном отношении он резко отличается от эпителия периферического нефрона. Периферические сосуды и прямые мочевые каналы обладают способностью секретировать калий, тогда как мочевой пузырь жабы таким свойством не отличается. Транспорт калия в почках — мощный и легко приспособляющийся механизм, который реагирует на широкий спектр стимулов, таких, как избыток или недостаток калия, нарушение кислотно-основного состояния, изменения в периферическом кровотоке и обеспечении натрием, изменения в уровне минералокортикоидов, различные скорости секреции калия или реабсорбция его [3, 9, 10, 13, 24]. Таким образом, в почке как млекопитающих, так и земноводных периферический нефрон является главным центром регуляции калиевого баланса. Это относится также и к периферическим сосудам и прямым мочевым каналам почек, где амилорид проявляет свое главное воздействие на транспорт электролитов. Это

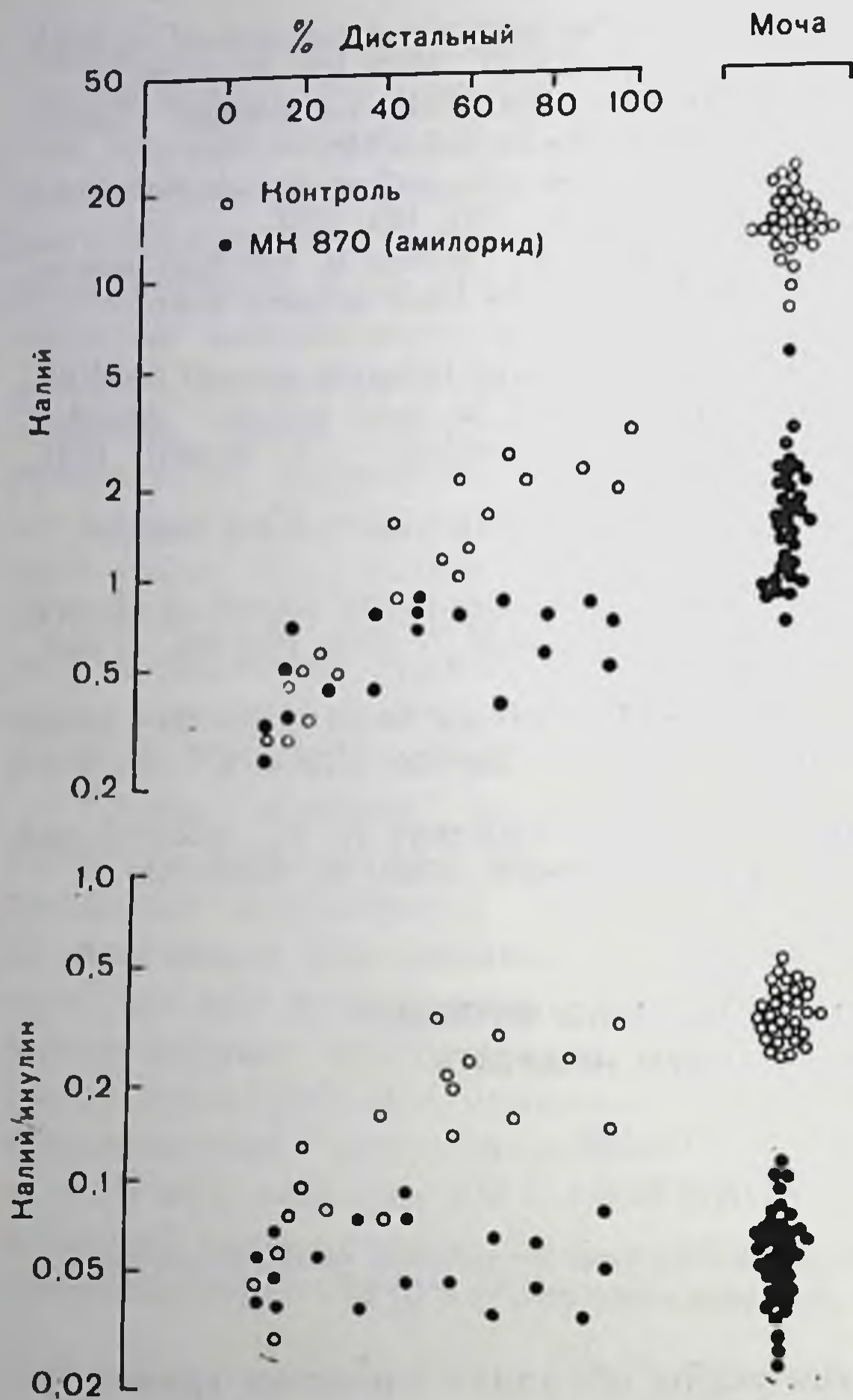


Рис. 139. Сумма концентрации калия и отношения концентраций калий/инсулин у крыс, содержащихся на контрольной диете, и крыс, получавших амилорид.

ростом его секреции, начиная с менее чем 5% от проходящего калия в начале периферического сосуда до примерно 30% за то время, пока жидкость достигает конца сосуда.

После добавления амилорида положение резко меняется. На рис. 139 (вверху) показано, что концентрация калия в периферическом сосуде (выраженная как отношение концентраций в сосудистой жидкости и плазме) только слегка возрастает и ни в одном случае это отношение не превышает единицу. На рис. 139 (внизу) видно, что секреция калия полностью подавлена. Этот эффект является очень сильным. Действие амилорида на секрецию калия остается неизменным, даже когда секреция калия стимулируется и «ускользание» от действия амилорида имеет место только после увеличения калиевых запасов организма [16, 17].

действие состоит в значительном уменьшении транспорта натрия, полном подавлении секреции калия и некотором ингибировании секреции протонов [6, 14, 15]. На рис. 139 показано основное влияние амилорида на эпителлий периферических сосудов, в частности на транспорт калия в периферических сосудах. Приведены данные, полученные на образцах крови крыс с умеренным диурезом [6], а для сравнения — результаты у контрольных, не получавших амилорида крыс. Очевидно, что в норме концентрация калия в жидкости периферических сосудов резко возрастает вдоль сосуда и продолжает расти по мере того, как жидкость проходит по прямым мочевым канальцам и протокам. Как показано на рис. 139 (внизу), этот рост сосудистой концентрации калия связан со значительным общим

Дополнительные воздействия амилорида на эпителий периферических сосудов состоят в подавлении реабсорбции натрия и значительном уменьшении нормальной трансэпителиальной разности потенциалов [6].

Meng подтвердил, что интралуминальный амилорид блокирует значительную долю переноса жидкости в закрученных периферических сосудах [20]. Относительно меньший натрийуретический эффект по сравнению с сильным антикалийуретическим действием находится в хорошем соответствии с небольшой нагрузкой сосудов натрием, нормально присутствующим в периферических сосудах и прямых мочевых канальцах [13].

Т а б л и ц а 33. Суммарное действие  $10^{-5}$  М амилорида в просвете на транспорт натрия и калия и трансэпителиальную разность электрических потенциалов в изолированных прямых мочевых канальцах почек

	Контроль	Амилорид
Разность потенциалов, мВ	-38,5	+5
Ток натрия, $\rho E\varphi \text{ см}^{-1} \text{ с}^{-1}$		
из просвета сосуда	8,6	1,8
и в просвет	1,4	0,9
«чистый»	7,2	0,9
Ток калия, $\rho E\varphi \text{ см}^{-1} \text{ с}^{-1}$		
«чистый»	3,0	0,05
$R_T, \Omega \text{ см}^2$	266	358

П р и м е ч а н и е. Разность потенциалов и потоки измеряли в 6 канальцах, электрическое сопротивление — в пяти сосудах [22].

В табл. 33 показано действие амилорида на прямые мочевые канальца почек *in vitro* [22]. Следует заметить, что снижение секреции калия в сосудах связано с очень эффективным подавлением общей реабсорбции натрия вследствие преимущественно уменьшения его потока из просвета протока в окружающую среду [22]. Кроме того, амилорид вызывает отклонение трансэпителиальной разности потенциалов от среднего значения —38 до +50 мВ. Следует заметить, что эта положительная разность потенциалов исчезает при добавлении диамокса, ингибитора карбоангидразы, и, видимо, она обусловлена реогенной секреторной разностью потенциалов, видимо, маскирует электрические проявления механизма секреции протонов.

Вполне вероятно, что происходит исчезновение или очень значительное снижение нормальной отрицательной разности потенциалов, которое ответственно за очень сильное подавление секреции калия в периферических сосудах. Подобный механизм был предложен, исходя из рассмотрения модели клетки периферического сосуда, включая некоторые ключевые элементы транспорта калия, и электрофизиологических экспериментов, описанных ниже (рис. 140).

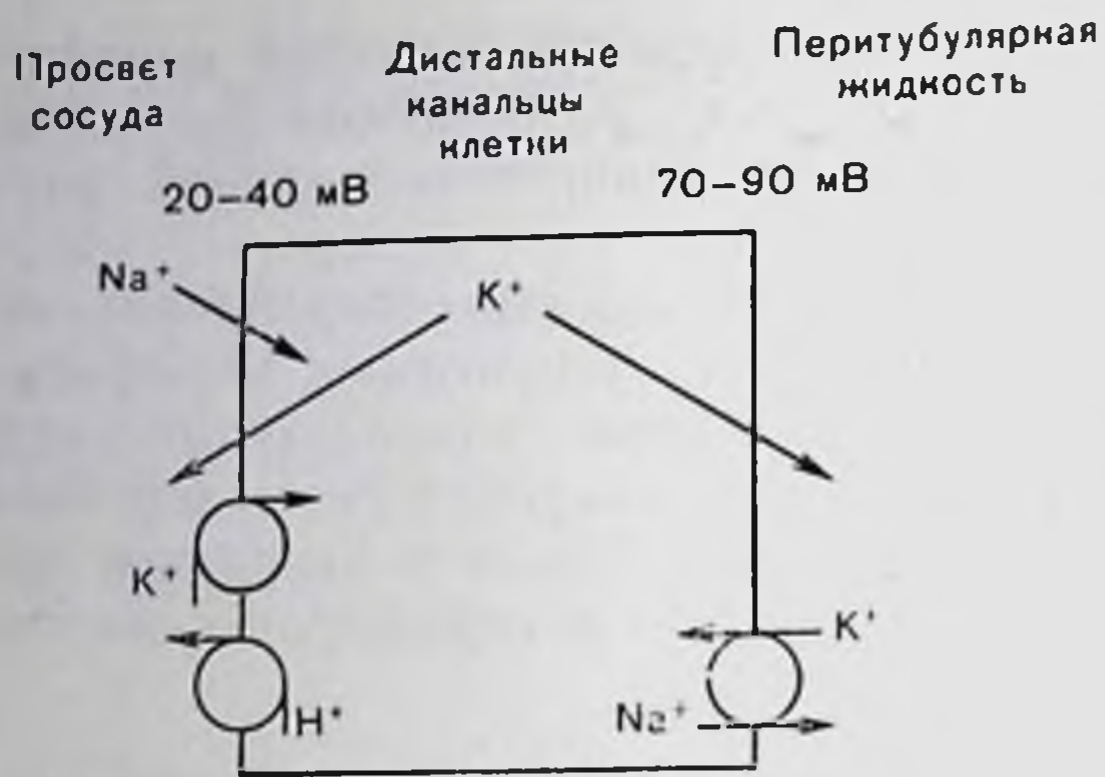


Рис. 140. Схема возможного механизма регуляции калия в дистальных канальцах. Детали см. в тексте.

сокой проницаемостью для калия, и данные, полученные на периферических сосудах земноводных, подтверждают точку зрения, что увеличение концентрации натрия может активировать реогенное выделение натрия через клеточную мембрану [23]; 2) луминальная клеточная мембрана частично деполяризована и обладает также относительно высокой проницаемостью для калия. По сравнению с перитубулярной клеточной мембраной луминальная клеточная мембрана в большей степени способствует выходу калия из клетки в просвет, поддерживая более низкий градиент электрического потенциала. Луминальная клеточная мембрана является также центром, где происходит вход в клетку натрия по градиенту электрохимического потенциала.

Точно установлено, что амилорид уменьшает проницаемость для натрия мембран клеток слизистой оболочки жабы [1, 8], мочевого пузыря кролика [19], внешней мембраны лягушки [2, 4, 5] и кожи жабы [18]. Это снижение луминальной натриевой проницаемости приводит к резкому падению общего транспорта натрия и снижению отрицательной разности потенциалов. Похоже, что снижение отрицательности является причиной действия амилорида на секрецию калия, так как отрицательная разность потенциалов — одна из движущих сил, способствующих переносу калия в просвет сосуда.

Мы прямо проверили возможность того, что электрические эффекты амилорида ответственны за подавление секреции калия. Это было достигнуто изменением электрических воздействий амилорида в результате приложения внешнего электрического поля и измерением распределения ионов калия в эпителии периферических сосудов [7].

Снижение трансэпителиальной отрицательной разности потенциалов после введения амилорида может быть связано с уменьшением либо луминальной деполяризации, либо электрогенного вытеснения натрия через мембрану; оба этих фактора могут сни-

На рис. 140 показаны характерные черты, которые следует обсудить при рассмотрении действия амилорида на уровне периферических сосудов [9—13: 1)  $K^+$ - $Na^+$ -насос внутри перитубулярной клеточной мембраны ответствен за высокий уровень клеточного калия и низкую концентрацию натрия внутри клетки, а также прямо или опосредованно за отрицательность клетки (около  $-70$  мВ). Клеточная мембрана обладает вы-



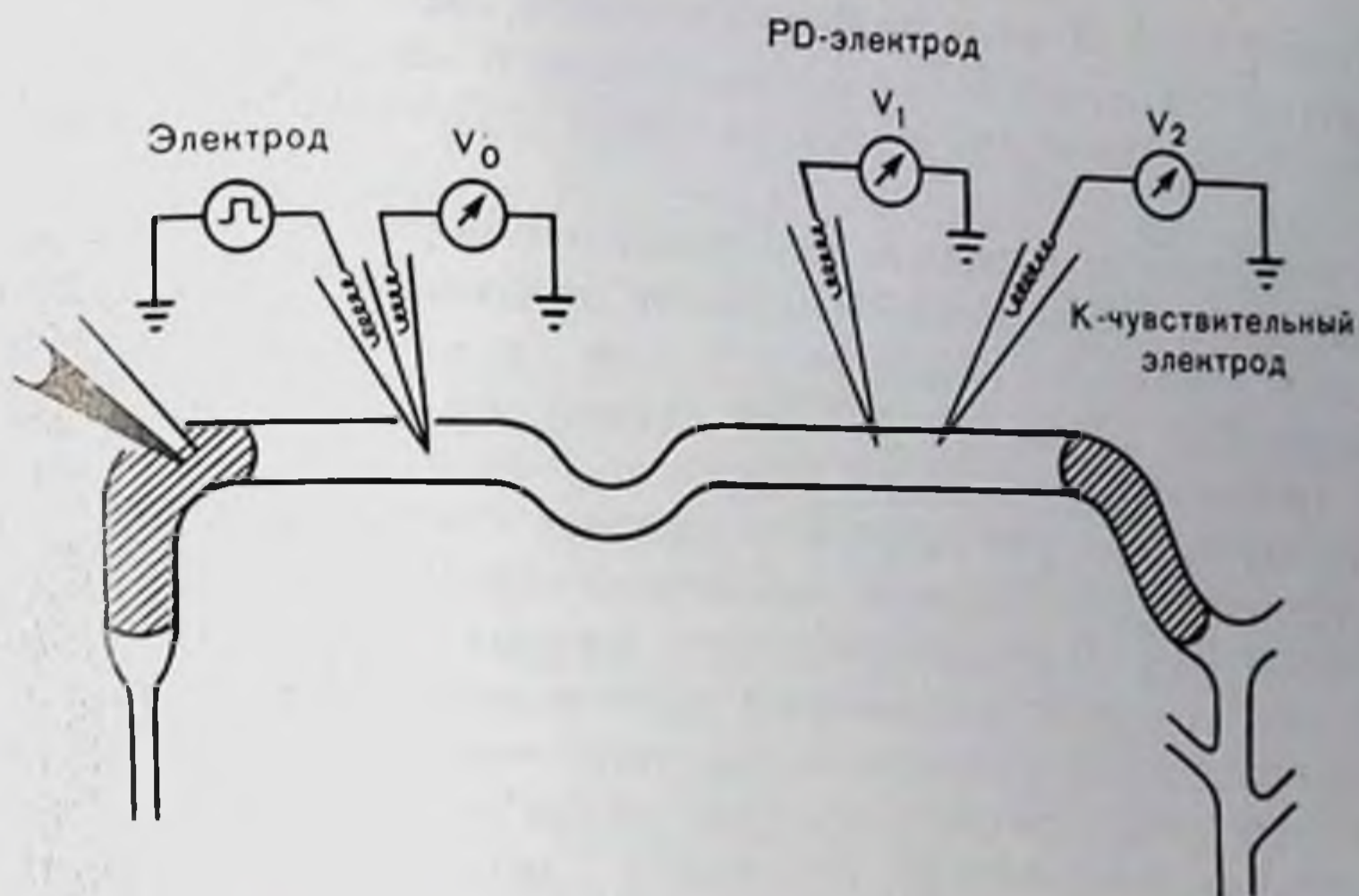


Рис. 141. Схематическое изображение постановки эксперимента по присоединению отдельных периферических капилляров млечопитающих к электрическому полю. Обратите внимание на электроды слева и микроэлектроды, отмечающие напряжение и активность калия, справа. Важно изолировать периферический сосуд от остальных сосудов маслом, чтобы предотвратить растекание изменений концентрации луминального калия.

жать электрическую поляризацию эпителия периферических сосудов. Тот факт, что на уровне капилляров очень сильное подавление тока натрия тесно связано с уничтожением отрицательной разности потенциалов, подтверждает точку зрения о существовании тесной связи между активным транспортом натрия и генерацией трансэпителиальной разности потенциалов.

На рис. 141 приведена схема серии экспериментов, в которых отдельные периферические сосуды млечопитающих были *in vivo* подвергнуты фиксации потенциала и получающаяся в результате трансэпителиальная разность в активности калия измерялась с помощью К-чувствительных микроэлектродов в непосредственной близости от микроэлектрода, измеряющего электрический потенциал [7]. Это необходимо, так как ток прикладывается в точке в начале сосуда и «проводящие» свойства периферического сосудистого эпителия приводят к значительному снижению потенциала вдоль сосуда.

Из наших наблюдений над контрольными и обработанными амилоридом сосудами следует, что активности сосудистого калия, которые достигались при различных значениях трансэпителиальной разностей потенциалов, в обработанных амилоридом сосудах не отличаются от аналогичных значений в контрольной серии [7]. Эти наблюдения подтверждают точку зрения, что восстановление нормальной отрицательной электрической разности потенциалов также нормализует и способность сосудов к секреции калия. Следовательно, действие амилорида на периферические сосуды не зависит от способности этого препарата уменьшать разность элек-

трических потенциалов, и фактически не вызывает сомнений, что последний эффект связан с уменьшением поступлений натрия в клетки периферических сосудов через луминальную клеточную мембрану.

В заключение отметим, что эпителий периферических сосудов представляет собой центр активного транспорта натрия и, кроме того, его хорошая проницаемость для калия способствует общей секреции этих катионов. В этом отношении периферический эпителий напоминает эпителий кожи лягушки после обработки амфотерацином-Б, которая делает паружные клетки мембраны (соответствующие луминальной клеточной мембране) проницаемыми для калия [21]. В периферических сосудах процесс секреции калия чувствителен к изменениям трансэпителиальной разности потенциалов. Калийдефицитное действие амилорида, т. е. его подавляющее действие на секрецию калия в периферических сосудах, можно полностью объяснить вызываемым препаратом исчезновением натрийзависимой трансэпителиальной разности потенциалов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bentley P. J.* Amiloride: A potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. — *J. Physiol.*, 1969, 195, 317—331.
2. *Biber T. U. L.* Effect of changes in transepithelial transport on the uptake of sodium across the outer surface of the frog skin. — *J. Gen. Physiol.*, 1971, 58, 131—144.
3. *Brenner B. M., Berliner R. W.* Transport of potassium. — In: *Handbook of Physiology, Section 8, Renal Physiology*, ed. by J. Orloff, R. W. Berliner, 1973, p. 497—520. American Physiological Society, Washington, D. C.
4. *Cuthbert A. W., Shum W. K.* Amiloride and the sodium channel. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1974, 281, 261—269.
5. *Cuthbert A. W., Shum W. K.* Characteristics of the entry process for sodium in transporting epithelia as revealed with amiloride. — *J. Physiol.*, 1976, 255, 587—604.
6. *Duarte C. G., Chomety F., Giebisch G.* Effect of amiloride, ouabain, and furosemide on distal tubular function in the rat. — *Am. J. Physiol.*, 1971, 321, 91—101.
7. *Garcia E., Malnic C., Giebisch G.* Effect of changes in electrical potential difference upon distal tubular potassium concentrations. — *Kidney Internat.*, 1976, 10, 584.
8. *Gatzky J. T.* The effect of K-sparing diuretics on ion transport across the excised toad bladder. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1971, 176, 580—584.
9. *Giebisch G.* Renal potassium excretion. — In: *The Kidney, Morphology Biochemistry, Physiology*, ed. by Ch. Rouiller, A. Muller, 1971, p. 329—382. Academic Press, New York and London.
10. *Giebisch G.* Some reflections on the mechanism of renal tubular potassium transport. — *Yale J. Biol. Med.*, 1975, 48, 315—336.
11. *Giebisch G.* Effects of diuretics on renal transport of potassium. — In: *Methods in Pharmacology*, 1977, v. 4, pp. 121—164. Plenum Press, New York.
12. *Giebisch G.* Renal potassium transport. — In: *Transport Across Biological Membranes*, edited by G. Giebisch, D. Tosteson, H. H. Ussing, 1978, v. 4, Springer — Verlag, Berlin — Heidelberg — London (in press).
13. *Giebisch G., Windhager E. E.* Electrolyte transport across renal tubular membranes. — In: *Handbook of Physiology, Section 8, Renal Physiology*, edi-

- ted by J. Orloff, R. W. Berliner, 1973, p. 315—376. American Physiological Society, Washington, D. C.
14. *Goldberg M.* The renal physiology of diuretics. — In: Handbook of Physiology, Section 8, Renal Physiology, edited by J. Orloff, R. W. Berliner, 1973, p. 1003—1032. American Physiological Society, Washington, D. C.
  15. *Guignard J. P., Peters G.* Effects of triamterene and amiloride on urinary acidification and potassium excretion in the rat. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1970, 10, 255—267.
  16. *Hohenegger M.* Potassium-escape phenomenon in rats during continuous application of amiloride. I. Influence of Difference daily potassium intake. — *Pharmacology*, 1971, 5, 301—306.
  17. *Hohenegger M.* Potassium-escape phenomenon in rats during continuous application of amiloride. IV. Etiology of the escape phenomenon. — *Pharmacology*, 1973, 9, 27—34.
  18. *Larsen E. H.* Effect of amiloride, cyanide and ouabain on the active transport pathway in toad skin. — In: Transport Mechanisms in Epithelia, A. A. Benzon Symposium V, edited by H. H. Ussing, N. Thorn, 1973, p. 131—143. Munksgaard, Copenhagen; Academic Press, New York.
  19. *Lewis S. A., Diamond J.* Na transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. — *J. Membr. Biol.*, 1976, 28, 1—40.
  20. *Meng K.* Comparison of the local effects of amiloride hydrochloride on the isotonic fluid absorption in the distal and proximal convoluted tubule. — *Pflüg. Arch.*, 1975, 357, 91—99.
  21. *Nielsen R.* Effect of amphotericin B on the frog skin in vitro. Evidence for outward active potassium transport across the epithelium. — *Acta Physiol. Scand.*, 1971, 83, 106—114.
  22. *Stoner L. C., Burg M. B., Orloff J.* Ion transport in cortical collecting tubule: Effect of amiloride. — *Am. J. Physiol.*, 1974, 227, 453—459.
  23. *Wiederholt M., Giebisch G.* Some electrophysiological properties of the distal tubule of *Amphiuma* kidney. — *Fed. Proc.*, 1974, 33, 387.
  24. *Wright F. S.* Potassium transport by the renal tubul. — In: MTP International Review of Science, Series 1, v. 6, Kidney and Urinary Tract Physiology, edited by K. Thurau, 1974, p. 79—106. Butterworths, London.

### ПОГЛОЩЕНИЕ И РАСПАД УАБАИНА, СВЯЗАННОГО С КЛЕТКАМИ HeLa

ДЖОН С. КУК, ЭМИЛИ Т. БРЭЙК  
(JOHN S. COOK, EMILY T. BRAKE)

*Биологическое отделение Университета штата Теннесси  
и Национальной лаборатории в Оак Ридже, Школа повышения  
квалификации в биомедицинских науках в Оак Ридже, Теннесси 37830, США*

Первым этапом фармакологического воздействия сердечных гликозидов на клетки является связывание лекарства с его специфическими поверхностными рецепторами — ориентированными наружу центрами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аз. (При высоких концентрациях гликозида наблюдается неспецифическое  $\text{K}^+$ -чувствительное связывание. Такое связывание в клетках человека не приводит к известным физиологическим последствиям и становится количественно важным только при уровнях лекарства, значительно превышающих использованные в настоящей работе, поэтому в дальнейшем на неспецифических эффектах мы останавливаться не будем.) Цель настоящего исследования заключалась в том, чтобы проследить путь гликозида от момента его первоначального связывания до освобождения из соответствующей чувствительной

клетки, а также оценить в параллельных экспериментах регенерацию клеток после гликозидной интоксикации. В настоящее время мы уже в состоянии сделать первые наброски механизмов, лежащих в основе указанных процессов, хотя из дальнейшего обсуждения и станет ясно, что некоторые важные детали до сих пор не выяснены.

Мы использовали  $^3\text{H}$ -уабанин и клетки из S3 клона HeLa [10]. HeLa-клетки были взяты для эксперимента главным образом из-за их принадлежности к типу клеток человека. Кроме того, размножаясь негативно, они могут быть получены в виде гомогенной популяции, что сильно упрощает интерпретацию полученных результатов. Наконец, после однократной обработки лекарством клетки можно вернуть в полноценную среду с адекватными добавками сыворотки, аминокислот, витаминов и источников энергии. В этой нормальной среде можно определять не только краткие физиологические реакции, но, удовлетворяя потребности растущих клеток, можно наблюдать также некоторые процессы регенерации, зависящие от синтеза макромолекул.

В среде роста, содержащей  $5,5 \text{ мМ } \text{K}^+$ , уабанин связывается с этими клетками с  $K_d \approx 5 \cdot 10^{-8} \text{ М}$  и ингибирует транспорт калия (измеренный с помощью аналога калия  $^{86}\text{Rb}$ ) с  $K_{\text{инт}} \text{ также } \approx 5 \cdot 10^{-8} \text{ М}$  [5]. Связывание не является ковалентным. Через несколько часов транспорт возвращается к норме, а через несколько дней связанный уабанин освобождается из клетки. По данным радиохроматографии в различных системах растворителей освобождается аутентичный уабанин [11]. Другими словами, детоксификация не зависит от метаболизма гликозида.

### МОДЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСВОБОЖДЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ЛЕКАРСТВА

Как показано на рис. 142, эта система служит примером экспериментальной модели для изучения связывания, освобождения, ингибирования транспорта и регенерации лекарств. Клетки были обработаны в течение 15 мин  $10^{-6} \text{ М}$  раствором  $^3\text{H}$ -уабанина, отмыты от свободного несвязанного гликозида и ресуспендированы в среде роста к нулевому времени. Из контрольных экспериментов мы знаем, что у этих клеток имеется  $0,9-1,1 \cdot 10^6$  специфических уабанинсвязывающих центров на клетку. Однако в этих экспериментах мы избежали полной блокады, которая может ингибировать рост клеток: было занято около 550 000 центров на клетку. На нижней части рисунка можно видеть, что при параллельном процессе связывания уабанинчувствительное поглощение  $^{86}\text{Rb}$  при нулевом времени сильно, но не полностью ингибируется.

Связанный уабанин освобождается из клетки комплексным путем. Представленная в полулогарифмических координатах кривая, описывающая освобождение лекарства, не падает по простой экспоненте, как можно было ожидать при простой диссоциации с поверхностных связывающих центров. Мы разложили эту кривую

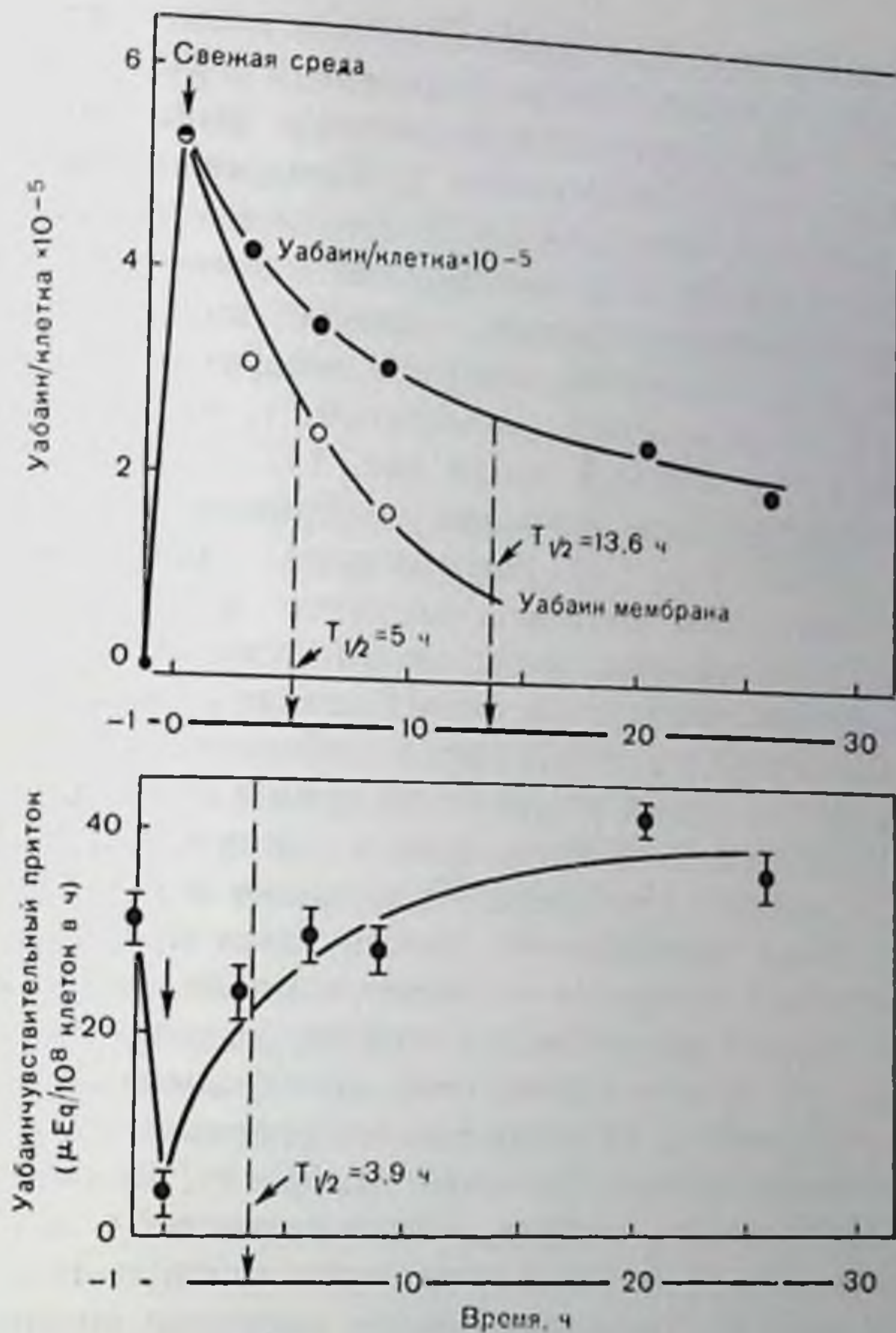


Рис. 142. Связывание и освобождение убаина и параллельное ингибирование и регенерация транспорта  $^{86}\text{Rb}$  (аналога  $\text{K}^+$ ) в клетках HeLa. Клетки инкубировали в течение 15 мин в среде роста (5,5 мМ  $\text{K}^+$ ) с  $10^{-6}$  М убаина при  $37^\circ\text{C}$ , центрифугировали и переносили в свежую среду роста, не содержащую гликозид. Отношение убаин/мембрана измеряли на изолированных мембранах, полученных при охлаждении в условиях пренебрежимо малого высвобождения убаина. Данный метод представляет собой модифицированный метод Atkinson и Summers [1]; восстановление мембран проводили, используя 5'-нуклеотидазу в качестве количественного маркера [3]. Кривая для отношения убаин/мембрана является кривой первого порядка, кривая убаин/клетка — суммой двух экспонент. В нижней части рисунка показано поглощение  $^{86}\text{Rb}$  в таких же клетках в виде убаинчувствительного ( $10^{-4}\text{M}$ ) 10-минутного поглощения  $^{86}\text{Rb}$  из среды роста [11].

теоретически и экспериментально на три одновременных процесса, каждый из которых имеет собственный коэффициент скорости первого порядка [6, 11]. Эти процессы и времена их полупротекания, как было установлено из нескольких экспериментов, представляют собой: а) диссоциацию из мембранных связывающих центров в среду,  $t_{1/2} = 5-8$  ч; б) интернализацию — активный процесс, связанный с эндоцитозом убаинсвязывающих центров и, по-видимому, связанный с деградирующей частью мембранного цикла, также  $t_{1/2} = 5-8$  ч; в) освобождение из клетки интерна-

лизованного лекарства,  $t_{1/2} = 50-70$  ч. Скорость первого процесса, простой диссоциации, можно определить либо работая с изолированными мембранами, либо используя целые клетки, в которых интернализация блокируется комбинированными ингибиторами деоксиглюкозы (продукт ее фосфорилирования эффективно снижает уровень АТФ). Оба метода дают одинаковые результаты. Вторым процессом, интернализацию, сначала определяли как разность между всем связанным клеткой лекарством и лекарством, связанным с плазматической мембраной, т. е. разность между двумя кривыми на верхней части рис. 142. Как было отмечено, обработка деоксиглюкозой и азидом уничтожает процесс интернализации, но не действует на диссоциацию. Далее мы покажем, что интернализированный материал является интрализосомальным. Наконец, в нашей оригинальной модели мы предполагали, что хотя третий процесс, медленное освобождение неизмененного уабанна, может представлять собой целый набор процессов, он тем не менее определяется одной стадией, которая характеризуется простым коэффициентом скорости первого порядка. Когда мы впервые построили модель, этот факт был только догадкой. В то время с равной долей вероятности можно было предположить, что интернализированный материал остается в каких-то частях клетки на то время, пока идет процесс, и затем выделяется одним выбросом. Скоро мы обнаружили, что экспериментальные данные лучше соответствуют освобождению по реакции первого порядка, чем по реакции одномоментного «выброса». В настоящее время возможная природа стадии, лимитирующей скорость всей реакции, стала несколько яснее по сравнению с тем временем, когда данная модель была настоящим «черным ящиком». Ниже мы более подробно остановимся на этом.

Наша модель дает возможность выявить некоторые связи между освобождением лекарства и регенерацией клетки. Во-первых, как диссоциация, так и интернализация протекают примерно с одной скоростью; около половины всего первоначально связанного лекарства попадает в клетку, тогда как другая половина сразу переходит в среду. Таким образом, к тому времени, когда количество  $^3\text{H}$ -уабанна, выделяемое в мембранную фракцию приближается к нулю, около половины начальной радиоактивности остается связанной с клеткой. Отмеченный выше эффект наблюдается в пределах от 15 до 25 ч после начального связывания. Во-вторых, если интернализация является циклическим процессом, то каждая связанная молекула уабанна, входящая в клетку, указывает на то, что в клеточную мембрану введен новый активный переносчик  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . Таким образом, диссоциация и интернализация приводят к потере уабанна с поверхности и восстановлению нормальных переносчиков калия и натрия с сопутствующей регенерацией. При этих двух процессах, протекающих параллельно, регенерация имеет  $t_{1/2} = 3-5$  ч. При сравнении верхнего и нижнего графиков рис. 142 (см. также рис. 145) легко заметить, что скорость регенерации транспорта соответствует скорости осво-

рождения лекарства из мембранной фракции, но не из всей клет- цитоза заблокированных транспортных центров, заменяя их новыми функциональными центрами.

Для любого связанного с мембраной лекарства верно утвержде- ние, что чем медленнее идет диссоциация из связывающих цент- ров, достигающая нулевой скорости для необратимо связанных лигандов, тем более важное значение для регенерации приобретает цикличность.

### ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ <sup>3</sup>H-УАБАИНА

После интернализации неметаболизированный гликозид дол- жен быть удален из клетки. Можно представить несколько путей, по которым идет освобождение гликозида из клетки. Мы начали свои исследования в этом направлении с поисков ответа на во- прос: в каком компартменте клетки связывается лекарство? Пе- реходит ли оно с течением времени в другие части клетки? Про- являют ли другие, независимые, соединения сходные свойства после связывания этими клетками?

Из экспериментов, подобных приведенным на рис. 142 и 145, мы получили данные, что количество лекарства на поверхности клетки через 24 ч после одномоментного связывания составляет очень незначительную часть от общего количества; мы можем пренебречь им в первоначальных экспериментах по фракциониро- ванию клеток. Однако ни в коем случае нельзя пренебрегать влиянием самого процесса фракционирования на субклеточное распределение такого нековалентно связанного вещества, как уабанин. Обычная техника, которая применяется для разрушения клеток типа HeLa, представляет собой суспендирование клеток в изотонической, неэлектролитической среде и дальнейшее разру- шение их большим числом (вплоть до 100) обработок в гомогени- заторе Dounce. Органеллы, освободившиеся из клеток, которые лизируются в ранних стадиях этого процесса, также подвергаются постоянному разрушению, которое, кроме того, может влиять и на процесс интеграции. В применении к аналитическому фрак- ционированию нам удалось этот факт из недостатка превратить в преимущество (рис. 143). Детали эксперимента описаны в под- писи к рисунку. В общих чертах опыт сводится к тому, что клет- ки, включающие интернализированный <sup>3</sup>H-уабанин (но практически не содержащие меченого уабанина, оставшегося на поверхности клетки), разрушают в разной степени и затем целые клетки (и ядра) удаляют низкоскоростным центрифугированием. Оче- видно, что для разрушения более 80% всех клеток необходимо более 20 гомогенизаций в гомогенизаторе Dounce. Это было уста- новлено по освобождению радиоактивности в первом низкоскоро- стном супернатанте (рис. 143, А). Фракции супернатанта (гомо- гената), которые содержали все освободившиеся органеллы, кро-

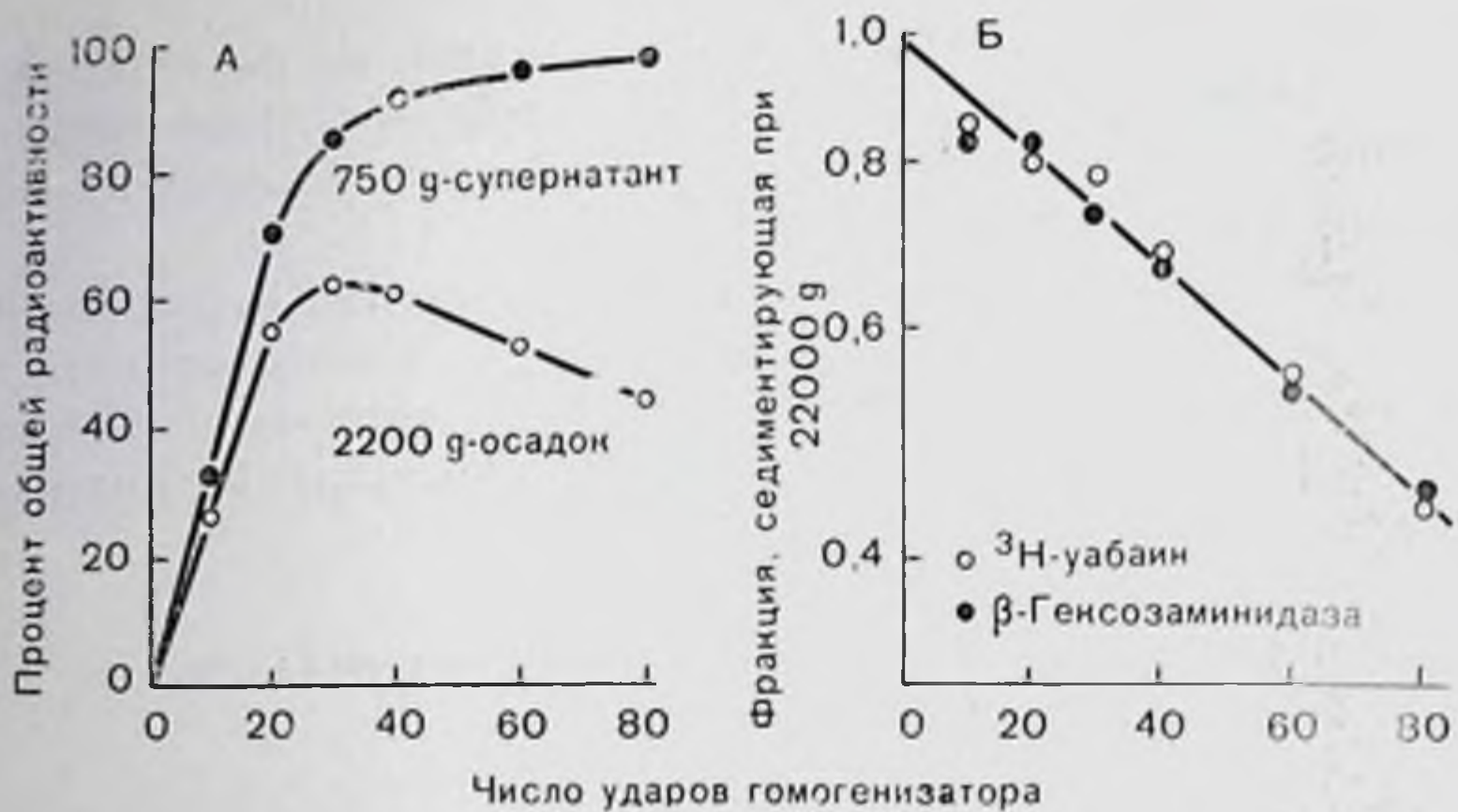
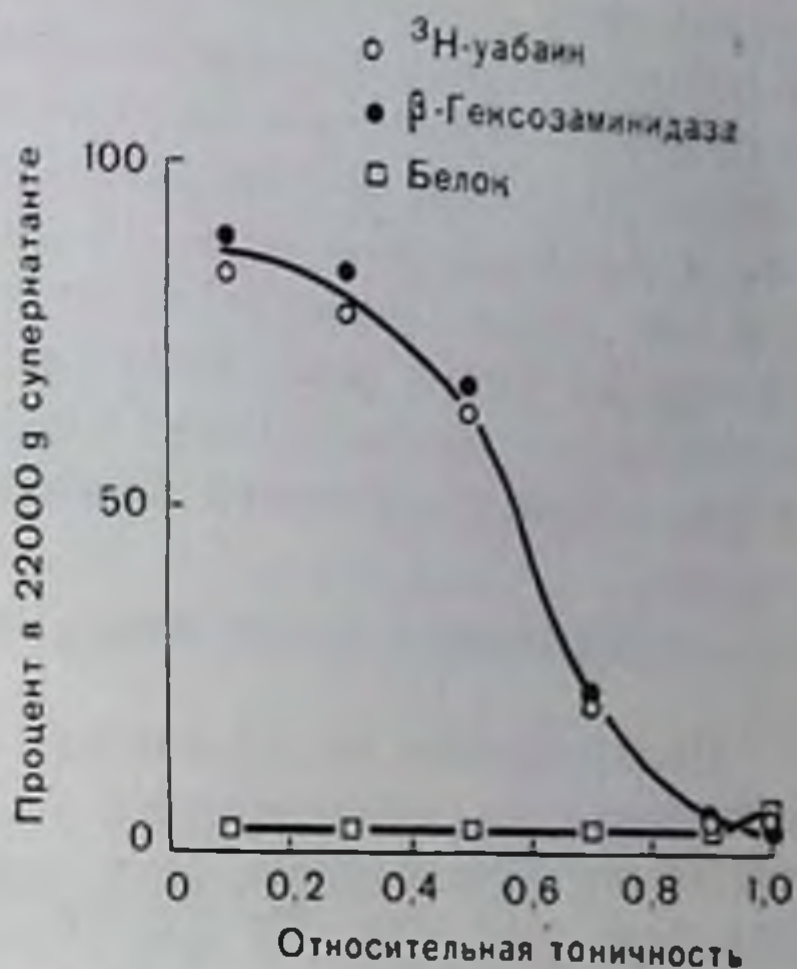


Рис. 143. Гомогенизация клеток HeLa и механическая ломкость убаинсодержащих частиц (лизосом) в гомогенатах клеток HeLa. Клетки метили <sup>3</sup>H-уабайном за 45 ч до эксперимента. К нулевому моменту времени около 1% от количества первоначально связанного лекарства остается на плазматической мембране (см. рис. 145) и 43% внутри клетки. Остаток убаина уходит из клетки путем диссоциации с мембраны в среду или путем выброса наружу убаина, попавшего в клетки вследствие эндоцитоза. Клетки суспендировали в И-среде (0,22 М маннитола, 0,07 М сахарозы, 0,002 М Нерес, 0,05% бычьего сывороточного альбумина, рН 7,4, 295 mosm), разрушали определенным числом ударов в гомогенизаторе Dounce и выдерживали 15 мин при 750 g (низкоскоростная центрифуга), получая при этом образец, содержащий intactные клетки и ядра в осадке и низкоскоростной супернатант, называемый гомогенатом. Гомогенат повторно центрифугировали при 22 000 g в течение 30 мин (высокоскоростная центрифуга), получая осадочную фракцию, содержащую лизосомы и митохондрии, а также другие клеточные органеллы, и супернатант, содержащий микросомы и растворимые компоненты клеток. А — разрушение и выделение intactных (седиментирующих) лизосом после гомогенизации в приборе Dounce. Верхняя кривая (черные кружки) — весь <sup>3</sup>H-уабайн из intactных клеток, обнаруженный в гомогенате, т. е. супернатанте первого низкоскоростного центрифугирования. Эта величина соотносится с числом клеток, разрушенных при определенном числе ударов в гомогенизаторе Dounce. Нижняя кривая (светлые кружки) — фракция всего <sup>3</sup>H-убаина из intactных клеток, полученных из осадка при 22 000 g. Это значение соотносится с фракцией intactных лизосом, полученных после определенного числа ударов в гомогенизаторе Dounce. Б — эквивалентность механической ломкости частиц, содержащих <sup>3</sup>H-уабайн, и β-гексозаминидазной активности [2] в гомогенате, который можно осадить при высокой скорости. В полулогарифмических координатах показана зависимость фракции, седиментирующей при 22 000 g от числа ударов в гомогенизаторе Dounce. Объяснение в тексте.

ме ядер, центрифугировали в течение 30 мин при 22 000 g, что вполне достаточно для осаждения intactных митохондрий и лизосом, но недостаточно для осаждения микросом. Мы рассчитали для каждого гомогената фракции радиоактивности, которые седиментируются при высших скоростях, и представили их как функцию числа циклов гомогенизации (рис. 143, Б). После того как практически все клетки разрушены, при дальнейшей гомогенизации седиментированные фракции радиоактивности становятся все меньше, причем уменьшение идет по экспоненте по отноше-



рис. 144. Осмотическая ломкость  $^3\text{H}$ -уабанисодержащих частиц из клеток HeLa. Клетки были помечены  $^3\text{H}$ -уабанном, и в течение 45 ч до начала эксперимента гликозид мог подвергнуться интернализации. Фракция, богатая интактными лизосомами, была получена по методу, описанному в подписи к рис. 143, после 30 ударов в гомогенизаторе Doupe (см. рис. 143, А). Аликвоты осадка при высокоскоростном центрифугировании были ресуспендированы в И-средах с различным разбавлением, их выдерживали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 10 мин и центрифугировали при 22 000 g в течение 30 мин. Осадки и супернатанты были проанализированы на  $^3\text{H}$ -уабанин (светлые кружки),  $\beta$ -гексозаминидазу (темные кружки) и белок (светлые квадраты). Белок определяли по собственной флуоресценции триптофана, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. Изотоничность (тоничность = 1.0) И-среды составила 295 mosml.



нию к «разрушенности» (см. рис. 143, Б). Если экстраполировать эту прямую линию к ординате, можно увидеть, что при нулевом уровне «разрушенности» 99% радиоактивности связано с седиментирующими частицами. Другими словами, в пределах точности метода анализа мы можем сделать вывод, что в растворимой фракции неразрушенных клеток свободный уабанин не обнаружен. Возможности данного метода анализа можно расширить, если учесть, что распределение уабанина аналогично распределению  $\beta$ -гексозаминидазы, удобного лизосомального ферментного маркера [2]. Так как оба белка обнаруживают одинаковую механическую «ломкость» по отношению к разрушению, мы условно можем принять, что они одинаково распределяются в гомогенате; это означает, что внутриклеточный уабанин сосредоточен в лизосомах. В пользу справедливости этого заключения говорит и наблюдение, что маркеры также распределяются взаимосвязанно, когда седиментирующая фракция подвергается гипоосмотическому шоку. В этом эксперименте мы отделяли седиментирующую фракцию от гомогената клеток, разрушенных 30 гомогенизациями, что отвечает условиям, когда можно с максимальным выходом получить уабанин, ассоциированный с частицами (см. рис. 143, А). Если аликвоту этой пробы, которая содержит значительную часть клеточного белка, ресуспендировать в изотонической, неэлектролитической среде, то затем практически все белки,  $^3\text{H}$ -уабанин и  $\beta$ -гексозаминидазу можно пересадить в течение 30 мин при 22 000 g (рис. 144). Если же аликвота той же пробы ресуспендируется в гипоосмотическом растворе, то  $^3\text{H}$ -уабанин и  $\beta$ -гексозаминидаза освобождаются, причем оба белка выделяются параллельно и в обратной зависимости от тоничности. Важно отметить, что это

совместное освобождение маркеров не связано с общей растворимостью белков; количество белка в конечной фракции супернатанта при осмотическом шоке не возрастает сколько-нибудь заметно. Наконец, в этом опыте совместно выделяющиеся  $^3\text{H}$ -уабанин и  $\beta$ -гексозаминидаза не могут быть осаждены даже в том случае, когда супернатант из лизосом после осмотического шока центрифугируют при 300 000 g в течение 30 мин; ясно, что здесь происходят значительные изменения в седиментационных свойствах освобождающихся лизосомальных маркеров.

### КИНЕТИКА ВЫДЕЛЕНИЯ $^3\text{H}$ -УАБАНИНА И $^{14}\text{C}$ -САХАРОЗЫ

Большинство из описанных выше экспериментов проводили с гомогенатами, полученными из клеток через 24—50 ч после мечення их  $^3\text{H}$ -уабанином. При определении механического разрушения (см. рис. 143, Б) для образцов, полученных через 1—2 дня после мечення, были зафиксированы одинаковые результаты. Хотя общее количество внутриклеточного уабанина постоянно уменьшается с периодом полуреакции около 60 ч, распределение белка между супернатантом и осадком при высокоскоростном центрифугировании как функция «разрушенности» всегда падает по одной и той же кривой. Этот результат позволяет сделать вывод, что по этому критерию (или по чувствительности к осмотическому шоку) между «молодыми» и «старыми» лизосомами нет заметной разницы. Потеря уабанина лизосомальными компартментами и выход его из целой клетки, видимо, носят случайный характер. Этот факт объясняет равенство констант скоростей первого порядка в описании экстернализации в нашем исследовании.

Для сравнения мы проследили за поглощением и выбросом сахарозы в тех же клетках. В отличие от уабанина сахароза не связывается с поверхностью клеток. Константа скорости ее поглощения не зависит от концентрации вплоть до 10 мМ. Аналогично уабанину сахароза не подвергается метаболизму в этих клетках. Применяя  $^{14}\text{C}$ -сахарозу в качестве маркера при пиноцитозе внеклеточной среды, мы обнаружили, что поглощение сахарозы в стационарном состоянии составляет около 0,05 мл на клетку или 2—3% клеточного объема в час. Через 2, 15, 45 ч поглощения последующее стационарное выделение имеет  $t_{1/2} = 40—60$  ч. Этот результат также подразумевает случайный обмен содержимого вриосом. Мы предположили, что пиносомы, содержащие сахарозу, сливаются с лизосомами, как было показано для других типов клеток с помощью морфологического теста [4, 8, 9]. Методы, которые мы использовали для исследования лизосомальной компартментализации уабанина, в случае с сахарозой не срабатывают достаточно надежно. Несвязанная сахароза легко выходит из лизосом при гомогенизации. Этот процесс, очевидно, обратим, так как изотонический раствор сахарозы позволяет сохранить латентность лизосомальных ферментов после окончания разрушения клеток, т. е. по-видимому, лизосомы восстанавливают свою непро-

ницаемость для сахарозы. Вероятно, лизосомальные мембраны не рвутся, а обратимо вытягиваются при низкой степени разрывности. У нас имеются доказательства того, что поверхность мембраны ведет себя таким образом, становясь обратимо проницаемой для сахарозы во время экспериментальных процессов (центрифугирование, ресуспендирование) и восстанавливая по их окончании относительную проницаемость. Во всяком случае в предположении, что лизосомы, содержащие сахарозу, сливаются с лизосомами, результаты, полученные с сахарозой и убаином, взаимно согласуются и показывают, что лизосомальное содержимое статистически выбрасывается в среду со временем полного обмена приблизительно 3 дня.

### МОДЕЛЬ ЭКСКРЕТИРОВАНИЯ ПЕМОМЕТАБОЛИЗИРОВАННЫХ ВЕЩЕСТВ

Все описанные выше наблюдения нам удалось свести в общую модель, и одновременно с этим выявить некоторые важные пробелы в наших знаниях. В соответствии с этой моделью убаин, который спонтанно не диссоциирует в среду, включается в клетку в связанном виде. Процесс этот активный и может ингибироваться АТФ-истощающими ядами. Как только убаин входит в клетку, видимо в кариосому, она сливается с лизосомами. Затем, даже при условии связывания убаина с лизосомами, первоначальные центры связывания убаина могут или разрушаться или сохраняться. Неопределенность связана здесь с тем, что объем клетки составляет  $1800 \text{ мкм}^3$ . Предположим, что объем лизосомы примерно равен 1% от общего объема клетки и что 300 000 молекул убаина интернализировались и перешли в интрализосомальное пространство, разрушив при этом первоначальные центры связывания. Внутрилизосомальная концентрация убаина будет в этом случае  $3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ , что в 1000 раз превышает  $K_d$  для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы. Известно, что вновь появляющиеся лизосомы постоянно сливаются с ранее существовавшими лизосомами [9] и в связи с этим подвергаются действию новых, незанятых убаинсвязывающих центров с той стороны клеточной поверхности, которая обращена внутрь лизосом. Исходя из концентрации убаина  $3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ , можно ожидать, что он будет быстро связываться с этими центрами и оставаться там до тех пор, пока эти центры в свою очередь не разрушатся, дав возможность убаину двигаться к вновь образовавшимся центрам. Таким образом, интрализосомальный убаин может быть связан со связывающими центрами, но для этого нет необходимости в первоначальных связывающих центрах, вместе с которыми лекарство интернализировано. Эта гипотеза, предложенная Holtman, в настоящее время проверяется. Пути движения гликозида из лизосомы к наружной части клетки неизвестны. Можно представить себе два варианта. Первый: убаин освобождается в лизосоме либо в результате диссоциации, либо при разрушении связывающих центров. Затем он

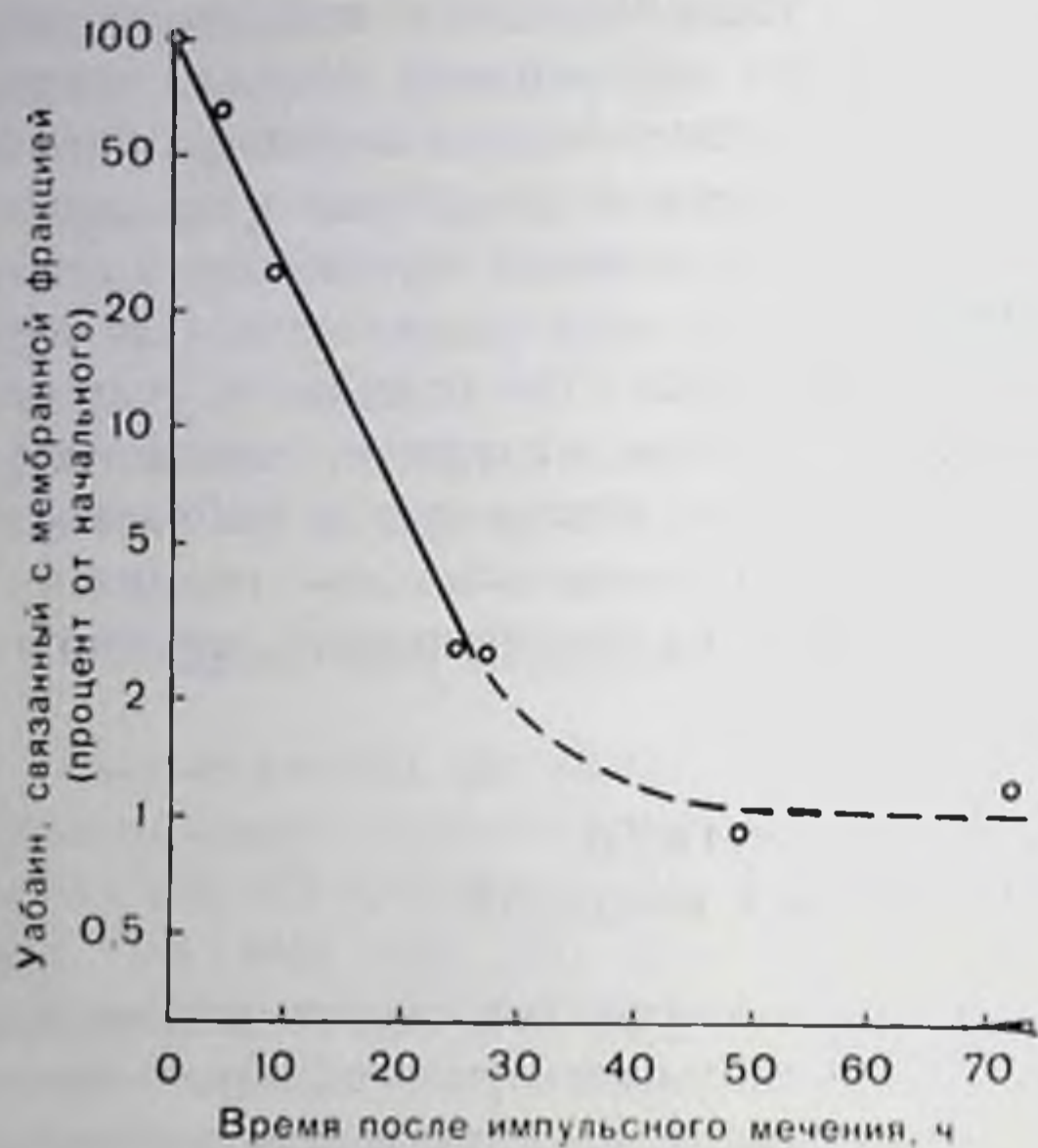


Рис. 145. Выделение уабанна из фракции плазматических мембран меченых клеток *HeLa*. Клетки метили  $2 \times 10^{-7}$  М  $^3\text{H}$ -уабанна в среде с  $0,55$  мМ  $\text{K}^+$   $10$ – $15$  мин при  $37^\circ\text{C}$  (в результате связанными оказались  $85\%$  из всех возможных центров), центрифугировали и ресуспендировали в среде роста, не содержащей гликозида. Мембраны получали по методу, описанному в подпункте к рис. 142.

могут давать одинаковую кинетику пассивной диффузии.

Вторым возможным механизмом является экзоцитоз, при котором уабаннсодержащие субклеточные частицы возвращаются и сливаются с клеточной поверхностью, при этом связанный уабанн выпячивается и таким образом оказывается во внеклеточной среде. Отсюда лекарство может легко диссоциировать и теряться в окружающей среде или часть его даже ренинтернализуется. Так как полупериод для экзоцитоза значительно больше, чем для диссоциации, то в этом случае можно ожидать сходного времени освобождения из клетки уабанна и сахарозы. Дополнительным подтверждением этого механизма можно считать тот факт, что потеря однократно связанного уабанна из мембранной фракции не снижается неопределенно долго. При больших промежутках времени и низкой поверхностной концентрации  $^3\text{H}$ -гликозида количество возмещенного уабанна в мембранной фракции имеет тенденцию к уменьшению по мере того, как интернализованное лекарство возвращается обратно к поверхности. Однако из-за низкой скорости и малых количеств циркулирующего  $^3\text{H}$ -уабанна (по сравнению с первоначально связанным количеством) этот процесс не влияет на измеряемое в ранние промежутки времени

проходит через лизосомальную мембрану в цитоплазму, а потом через плазматическую мембрану — во внешнюю среду. Полупериод такого высвобождения, равный  $60$  ч, возможно, отражает как раз диффузный механизм этого процесса. Однако если принять этот механизм, то свободный гликозид должен обнаруживаться в растворимой фракции клеток, а по нашим данным, свободный уабанн никогда не присутствует там в сколько-нибудь значительных количествах (максимум  $5\%$  от количества уабанна в лизосомальном компартменте). Кроме того, сахароза освобождается из клетки примерно с той же скоростью, что и уабанн; в связи с этим кажется маловероятным, что такие разные молекулы, одна связанная, а другая нет,

количество связанного с изолированными мембранами уабанина. В соответствии с гипотезой рециклинга находится тот факт, что цинк сохраняется только около 1% лекарства (рис. 145). Хотя эти результаты являются многообещающими, они не подкреплены количественными расчетами, и до настоящего времени механизм экзоцитоза неизвестен. Несмотря на эти неопределенности, ясно, что интернализация поверхностных молекул может служить эффективным путем вывода лекарства на клеточном уровне. Многие лекарства, например бунгаротоксин, можно окончательно разрушить при инкубации с лизосомальными гидролазами [7]. Но даже в том случае, когда нет подходящего фермента и такое поверхностно-активное лекарство, как уабанин, не может метаболизировать в лизосомах, внутриклеточный захват сам по себе может быть важным компонентом в клеточной регенерации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Atkinson P. H., Summers D. F.* Purification and properties of HeLa cell plasma membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 5162—5175.
2. *Barrett A. J.* Lysosomal enzymes. — In: *Lysosomes, a Laboratory Handbook*, ed. by J. T. Dingle, 1972, p. 46—135. American Elsevier, New York.
3. *Brake E. T., Will P. C., Cook J. S.* Characterization of HeLa 5'-nucleotidase: A stable plasma membrane marker. — *Membrane Biochem.*, 1978 (in press).
4. *Cohn Z. A., Ehrenreich B. A.* The uptake, storage, and intracellular hydrolysis of carbohydrates by macrophages. — *J. Exp. Med.*, 1969, 129, 201—226.
5. *Cook J. S., Vaughan G. L., Proctor W. R., Brake E. T.* Interaction of two mechanisms regulating alkali cations in HeLa cells. — *J. Cell. Physiol.*, 1975, 86, 59—70.
6. *Cook J. S., Will P. C., Proctor W. R., Brake E. T.* Turnover of ouabain — binding sites and plasma membrane proteins in HeLa cells. — In: *Biogenesis and Turnover of Membrane Macromolecules*, ed. by J. S. Cook, 1976, p. 15—36. Raven Press, New York.
7. *Fambrough D. M., Devreotes P. N.* Development of chemical excitability in skeletal muscle. — In: *Biogenesis and Turnover of Membrane Macromolecules*, edited by J. S. Cook, 1976, p. 121—144. Raven Press, New York.
8. *Glauert A. M., Fell H. B., Dingle J. T.* Endocytosis of sugars in embryonic skeletal tissues in organ culture. II. Effect of sucrose on cellular fine structure. — *J. Cell. Sci.*, 1969, 4, 104—131.
9. *Holtzman E.* *Lysosomes: A Survey*. Springer-Verlag, 1976, New York.
10. *Puck T. T., Marcus P. I., Cieiura S.* Clonal growth of mammalian cells in vitro. — *J. Exp. Med.*, 1956, 103, 273—284.
11. *Will P. C., Longworth J. W., Brake E. T., Cook J. S.* Analysis of intracellular drug (ouabain) sequestration as a mechanism of detoxification. — *Mol. Pharmacol.*, 1977, 13, 161—171.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Аденилатциклаза, разделение** 135  
 — реактивация, влияние D, L-изопротеренола 138  
 — реконструирование 135  
**Аденозин, влияние на реакции тканей при гипоксии** 126  
 — — — — — стимуляции нервов пуринергических 126  
 **$\alpha$ -Адренорецепторы, влияние на проницаемость мембран** 102  
 **$\beta$ -Адренорецепторы, влияние на проницаемость мембран** 111  
**Амилоридин, действие на функции периферического нефрона** 349  
**Анионы, свойства** 237  
**Антигены поверхности лимфоцита** 37  
**Антиэстрогены** 159  
**АТФ, влияние на реакции тканей при гипоксии** 126  
 — — — — — стимуляции нервов пуринергических 126  
 — — — — — синтез простагландинов 127  
**Ацетилхолин, влияние на выход фосфата из нервных волокон** 95  
 — действие в присутствии атропина 99  
 — — — — — гексаметония 99  
 — — — — — диизопропилфторфосфата 99  
 — — — — — Ли-Локе 99  
 — — — — — Трис-Локе 99  
 — — — — — Холли-Локе 99  
 — — — — — тетраэтиламмония 99  
 — — — — —  $\alpha$ -тубокурарина 99  
 — — на железы внешнесекреторные 85  
 — — — — — мышцу гладкую 84  
 — — — — — сердечную 85  
 — рецепторы мускариновые 89  
 — — — физиология 82  
 — — — никотиновые 89  
**Бактериородопсин** 272  
 — диффузия вращательная в липидных мембранах 272  
**Белки мембранные, вращение в эритроцитах человека** 270  
 — — диффузия вращательная 268  
 — — — — — измерение с помощью импульсного фотолиза 268  
 — — — — — основные, выделение 71  
 — трансмембранные 24  
**Бензоаты, свойства** 239  
**Бензокаин, структура** 45  
**Бикарбонат, роль в транспорте лития через мембрану эритроцита** 306  
**Гексанаил, структура** 45  
**Гель-электрофорез в полиакриламидном геле, анализ иммунопреципитатов** 26  
**Гипотеза градиента** 323  
**Гонадотропины, автордиография** 205  
 — гипофизарные 182  
 — иммуноцитохимия 205  
 — связывание 209  
 — — — — — центры связывающие, локализация в клетках-мишенях 181  
**Гормоны гонадотропные, локализация** 181  
 — — — — — места связывания в яичнике млекопитающих 198  
 — кинетика связывания и метаболизма 200  
**ДНГСК, связывание** 222, 223  
 — — — — — влияние динитрофенилирования 224, 226  
**Дифракция оптическая, методы** 280  
**Допамины, влияние на проницаемость мембран** 110  
**Иммунность, теория приобретения методом клонального отбора** 33  
**Иммунопреципитация, эксперименты** 29  
**Иммуноэлектрофорез перекрестный, результаты** 23  
**Калий, выход из клеток, скорость** 263  
**Канал(ы) ионный(е) аксона** 44  
 — — — — — блокирование лекарствами 43  
 — — — — — возможность блокирования агонистами 52  
 — — — — — единичный, проводимость в присутствии блокаторов канала 50  
 — — — — — мышечный концевой пластинки 48  
 — — — — — натриевый как рецептор лекарств 243  
 — — — — — связывание токсинов 255  
**Катехоламины, влияние на ионную проницаемость клеточных мембран** 102  
**Катионы, свойства** 237  
**Кислота фенилуксусная, производные, свойства** 241  
**Лекарства, механизм действия, блокирование ионного канала** 43  
**Лигнокаин, структура** 45  
**Лимфоидная система, взаимодействие между клетками** 36  
**Лимфоциты, активация** 37  
 — — — группы 33  
 — — — как модель для изучения мембранных явлений 38  
 — — — поверхность, антигены 37  
**В-Лимфоциты** 33  
**Т-Лимфоциты** 33  
 — — — мембраны клеточные, рецепторы, природа 35  
**Липиды мембранные, значение** 55  
**Литий, антипорт Na-зависимый** 296  
 — — — — — природа 300  
 — — — — — транспорт через мембраны эритроцитов человека 296  
 — — — — — — — — — стимуляция бикарбонатом 306  
**Мембрана(ы) внутренняя, поверхность, структура** 22  
 — — — — — клеточные, проницаемость ионная, влияние катехоламинов 102

- — рецепторы, изучение иммунологическое 32
- липидные, диффузия вращательная бактериодонсина 272
- плазматическая лимфоцитов, структура 18
- — эритроцитов свиньи, фракционирование 19
- — проницаемость, влияние  $\alpha$ -адренорецепторов 102
- — —  $\beta$ -адренергических рецепторов, механизмы действия 107
- — — влияние допамина 110
- узловые, природа 256
- *Halobacterium halobium*, изучение методом замораживания-скалывания 278
- Мембранные липиды, значение 55
- Мембранный шум, исследование рецепторов лекарств 40
- Молекула(ы) биологические, происхождение, гипотеза Опарина 10
- — — — Haldane 10
- — — — нейтральные, свойства 237
- — — — стеринная, структура 10
- — — — функции 10
- — — — холестерина, значение для мембран 14
- Мускариновые реакции, кинетика 86
- — — — медиаторы 87
- — — — рецепторы, выделение 84
- — — — гетерогенность 88
- — — — физиология 84
- Насос натриевый нативный, стехиометрия 332
- — — — узловые, природа 256
- — — — реконструированный, стехиометрия 334
- Натрий, самообмен в эритроцитах быка 291
- — — — — влияние лития 293
- — — — — система, обменная, ингибирование ионами водорода 294
- — — — — флорентином 294
- «чистый» ток, создаваемый градиентом натрия 292
- Нервно-мышечное соединение млекопитающих 63
- Нефрон периферический, функции, роль амилоридина 349
- Носитель глюкозы из мембраны щеточной почечной каемки, характеристика 325
- Обмен литий-натриевый сопряженный в эритроцитах быка 288
- «Овершут» 326
- Пероксидаза, эксперименты *in vitro* 199
- — — — *in vivo* 199
- Пластинка концевая мышечная, ионные каналы 48
- Прокаин, структура 45
- Пуринорецепторы, структура и активность, взаимосвязь 125
- P1-Пуринорецепторы, влияние аденилатциклазы 122
- — — — антагонистов 121
- — — — АДФ 122
- — — — АМФ 122
- — — — АТФ 123
- — — — распределение в тканях 124
- P2-Пуринорецепторы, влияние антагонистов 122
- — — — АДФ 123
- — — — АМФ 123
- — — — АТФ 123
- — — — распределение в тканях 124
- Реакции мускариновые, кинетика 86
- — — — медиаторы 87
- Рецепторы  $\beta$ -адренергические, влияние на проницаемость мембран 107, 111
- — — — ацетилхолиновые в нервно-мышечном соединении млекопитающих, ультраструктура 59
- — — — идентификация иммунологическая 75
- — — — мускариновые 89
- — — — никотиновые 89
- — — — структура 67
- — — — у пациентов с миастенией 73
- — — — гормонов 133
- — — — действие 143
- — — — концентрация в клетках-мишенях 150
- — — — распределение в клетках-мишенях 157
- — — — свойства 143
- — — — лекарств, исследование методом мембранного шума 40
- — — — и токсинов в местах, контролирующей проницаемость мембраны 220
- — — — транспорт 262
- — — — мембран клеточных, исследование иммунологическое 32
- — — — Т-лимфоцитов, природа 35
- — — — мускариновые, выделение 84
- — — — гетерогенность 88
- — — — локализация детальная, выявление 83
- — — — распределение 82
- — — — физиология 82
- — — — нейротрансмиттеров 59
- — — — пуринергические, типы 120
- — — — регенерация, механизм гипотетический 212
- — — — эстрадиола, взаимодействие с гепарин-агарозой 169
- — — — очищенный, свойства 176
- — — — форма нативная, очистка 174
- — — — эстрогенов в матке 166
- — — — — взаимодействие с гепарином 166
- — — — — восприимчивость к действию гормонов 142
- Сакситоксин, активность фармакологическая 243
- — — — связывание с тканями 249
- Салицилаты, свойства 238
- Система лимфоидная, взаимодействие между клетками 36
- Субпопуляция везикул, использование для идентификации трансмембранных белков 25
- Тетродотоксин, активность фармакологическая 244
- Токсин, взаимодействие с рецептором 250
- — — — связывание с мембранами 253
- Трансмиттеры ложные, исследование с использованием анализа шума 41
- Уабанин, свойства 355
- — — — — связанный с клетками HeLa, поглощение 355
- — — — — — — — — — распад 355
- Фосфат, выход из нервных волокон, влияние ацетилхолина 95
- — — — — — — — — — ингибиторов холинэстеразы 99
- — — — — — — — — — холинноподобных соединений 88
- Фуроземид, действие на нечувствительный к уабанину ток калия и хлора в клетках Эрлиха 316
- Шум мембранный, использование при исследовании ложных трансмиттеров 41
- Электронная микроскопия по методу замораживания-скалывания-тракления 279