

Н. Н. НИКОЛЬСКИЙ, В. И. СКОПИЧЕВА, член-корреспондент АН СССР А. С. ТРОШИН

### МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ОУАБАИНА НА ТРАНСПОРТ САХАРОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЛЯГУШКИ

В настоящее время установлено, что в мышечной ткани отсутствует прямая связь между транспортом сахаров и  $\text{Na}^+$ , характерная для эпителиальных клеток кишечника и почек. Однако в литературе имеются данные о влиянии ингибитора натриевой помпы — оуабаина на транспорт сахаров в мышечной ткани теплокровных. В большинстве работ отмечалось стимулирующее действие оуабаина (<sup>1-4</sup>). На том же самом объекте — диафрагме крысы обнаружено тормозящее влияние оуабаина на транспорт сахаров, и на этом основании высказано предположение о возможной связи транспорта сахара и ионов натрия и в мышечной ткани (<sup>5, 6</sup>).

Выяснение механизма действия оуабаина представляет принципиальный интерес для понимания взаимосвязи транспортных процессов. Поэтому настоящая работа была посвящена детальному исследованию характера влияния оуабаина на транспорт сахаров в скелетных мышцах лягушки.

Работа проводилась на изолированных портняжных мышцах лягушки. После препаровки мышцы выдерживались 12—18 час. в растворе Рингера при 2—4°. В большинстве опытов мышцы преинкубировались в растворе Рингера с оуабином в течение 3 час. В ряде опытов мышцы предварительно выдерживались либо сутки, либо 3 часа в безнатриевых растворах, а затем на 3 часа помещались в безнатриевые растворы с оуабином. Ионы натрия заменялись на ионы триса, холина или сорбит. В качестве стимулирующих агентов, вызывающих ускорение транспорта сахаров, были использованы инсулин, 2,4-динитрофенол и калиевая контрактура. Измерение скорости транспорта *D*-ксилозы проводилось путем 45-минутной инкубации мышц при 24° в соответствующих растворах, содержащих ксилозу в концентрации 33 мМ и сахарозу в концентрации 7,5 мМ. Методы определения сахаров и расчет внутриклеточной концентрации ксилозы изложены ранее (<sup>7</sup>). Содержание в мышцах  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  определялось с помощью пламенной фотометрии.

В соответствии с литературными данными было установлено, что оуабаин оказывает стимулирующее влияние на транспорт сахаров. Величина эффекта зависит от концентрации оуабаина, достигая максимума при  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Дальнейшее увеличение концентрации до  $1 \cdot 10^{-4}$  М вызывает меньшее ускорение транспорта.

Концентрация оуабаина, М	0 (контроль)	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
Скорость транспорта ксилозы, ммол/час	$2,1 \pm 0,5$	$4,4 \pm 1,0$	$6,4 \pm 0,8$	$8,4 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,4$

Такое снижение стимулирующего действия оуабаина при увеличении его концентрации ранее в литературе не описывалось.

Иной характер влияния оуабаина был обнаружен в условиях стимуляции транспорта сахаров инсулином, 2,4-динитрофенолом или калиевой контрактурой. Результаты опытов представлены на рис. 1. Оказалось, что преинкубация мышц в растворе оуабаина вызывает отчетливое торможение транспорта независимо от природы стимулирующего фактора. Следует

отметить, что при концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  *M* тормозящий эффект выражен слабее и различие между уровнем транспорта в условиях стимуляции и в присутствии только одного оуабайна меньше, так как скорость транспорта в последнем случае уже увеличена. Наблюдаемое тормозящее действие оуабайна может быть результатом как непосредственного влияния ингибитора на транспорт сахаров, так и следствием подавления процесса активации транспорта. Торможение процесса стимуляции транспорта характерно для большой группы аминов и амидов, и в этом случае эффект

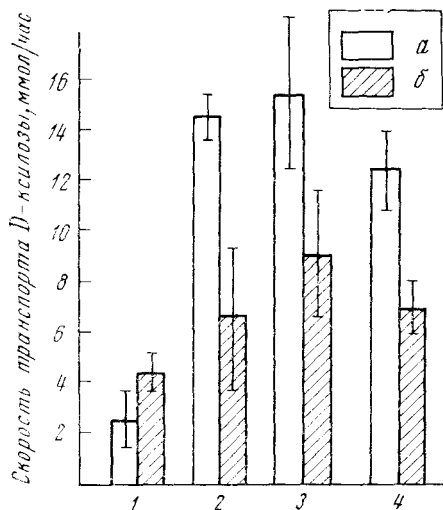


Рис. 1. Тормозящее влияние оуабайна на стимуляцию транспорта глюкозы при действии инсулина, 2,4-динитрофенола, калиевой контрактуры. 1 — контроль, 2 — инсулин, 3 — ДНФ, 4 — калиевая контрактура. Доверительные интервалы средних 95%. *a* — без оуабайна, *b* — в присутствии оуабайна

активации транспорта не действие оуабайна как таковое, а контрактуру. В наших опытах контрактуры не наблюдалось. Очевидно, стимуляция транспорта обусловлена иными причинами.

Другими авторами <sup>(2)</sup> высказывалось предположение о том, что действие оуабайна на транспорт сахаров опосредуется через изменение внутриклеточных концентраций ионов. Для выявления этой возможности нами было определено содержание в мышцах  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  после 4 час. инкубации мышц в растворе с оуабайном. При  $1 \cdot 10^{-4}$  *M* оуабайне внутриклеточная концентрация калия уменьшилась на 20 *mM*, а внутриклеточная концентрация натрия увеличилась на 24 *mM*. При действии  $1 \cdot 10^{-5}$  *M* оуабайна эти значения составляли соответственно для калия 30 *mM* и для натрия 26 *mM*. Следовательно, обе концентрации ингибитора оказывают практически одинаковый эффект на распределение ионов. Если влияние оуабайна на транспорт сахаров опосредованно, то, по-видимому, можно ожидать одинаковую стимуляцию транспортной системы. Тем не менее стимуляция транспорта выражена сильнее при действии  $1 \cdot 10^{-5}$  *M* оуабайна, а тормозящее влияние, наоборот, проявляется сильнее при более высокой концентрации ингибитора. Вероятно, более низкий уровень активации при увеличении концентрации оуабайна до  $1 \cdot 10^{-4}$  *M* объясняется преобладанием тормозящего эффекта над стимулирующим.

Если стимулирующее или тормозящее влияние оуабайна связано с изменением внутриклеточных концентраций ионов калия и натрия, то в

проявляется только при действии данных веществ до стимулирующего агента <sup>(8, 9)</sup>. Поэтому для проверки характера действия оуабайна были поставлены опыты с внесением оуабайна в раствор после полного развития эффекта инсулина, ДНФ или калиевой контрактуры. Было обнаружено, что при такой последовательности оуабайн тормозит транспорт глюкозы в той же степени. Следовательно, оуабайн влияет не на процесс активации, а непосредственно на процесс транспорта. Таким образом, оуабайн может оказывать на транспорт сахаров двойной эффект, вызывая ускорение базального транспорта и торможение стимулированного.

Относительно механизма действия оуабайна в литературе нет единого мнения. По данным Клаусена <sup>(3, 4)</sup>, стимуляция транспорта в мышечной ткани теплокровных при действии оуабайна развивается сравнительно медленно и совпадает с началом контрактуры. Поэтому Клаусен считает непосредственной причиной

безнатриевых средах этот эффект не должен проявляться. С этой целью было изучено действие оуабайна на транспорт ксилозы в портяжных мышцах лягушки в безнатриевых средах. Результаты опытов (табл. 1) показывают, что замена ионов  $\text{Na}^+$  на трис, холин или сорбит снимает стимулирующий эффект оуабайна на транспорт ксилозы. Отсутствие стимулирующего влияния ингибитора наблюдается во всех случаях: и когда мышцы предварительно сутки выдерживались в соответствующих безнатриевых растворах, и когда инкубация в этих растворах длилась только 3 часа.

Таблица 1

Влияние  $1 \cdot 10^{-5} M$  оуабайна на скорость транспорта ксилозы в портяжных мышцах лягушки в безнатриевых растворах

Среда инкубации	Скорость транспорта ксилозы, ммол/час	
	без оуабайна	в присутствии оуабайна
Раствор Рингера	$2,7 \pm 2,0$	$14,0 \pm 1,0$
Замена $\text{Na}^+$ на трис	$3,4 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,4$
холин	$4,8 \pm 1,7$	$4,0 \pm 0,7$
сорбит	$9,8 \pm 1,4$	$5,4 \pm 2,0$

Таблица 2

Влияние  $1 \cdot 10^{-4} M$  оуабайна на стимулированный пнеулином транспорт ксилозы в портяжных мышцах лягушки в безнатриевой среде

Условия инкубации	Скорость транспорта ксилозы, ммол/час	
	без пнеулина	в присутствии пнеулина
Раствор Рингера	$1,3 \pm 0,1$	$16,0 \pm 2,0$
Замена $\text{Na}^+$ на трис	$0,6 \pm 0,1$	$14,0 \pm 1,0$
Замена $\text{Na}^+$ на трис + оуабайн	$3,6 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,8$

Таким образом, стимулирующее действие оуабайна опосредуется через изменение внутриклеточных концентраций ионов, причем непосредственное действие на транспортную систему сахаров оказывают скорее не ионы  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ , а ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , внутриклеточная концентрация которых может зависеть от соотношения внутриклеточных концентраций калия и натрия (<sup>2</sup>). Возрастание внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при действии оуабайна, по всей вероятности, обеспечивается либо за счет выхода  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума, либо увеличения входа  $\text{Ca}^{2+}$  из среды через поверхностную клеточную мембрану. Последняя возможность убедительно показана в опытах на сердечной мышце (<sup>10, 11</sup>). Однако отсутствие стимулирующего действия оуабайна, наблюдаемое нами в безнатриевых средах, делает более вероятным, во всяком случае для скелетных мышц лягушки, предположение об увеличенном выходе  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума в условиях повышения внутриклеточной концентрации  $\text{Na}^+$ .

В отличие от стимулирующего действия, ингибирующий эффект оуабайна не зависит от присутствия в среде ионов натрия (табл. 2). Следовательно, тормозящее влияние оуабайна на транспорт сахаров не связано с действием ингибитора на распределение ионов. Поэтому представляется маловероятным непосредственное сопряжение транспорта сахаров с транспортом  $\text{Na}^+$ , как пассивным, так и активным. По нашему мнению, тормозящий эффект оуабайна может объясняться влиянием на транспортную систему, подобно действию специфических ингибиторов транспорта сахаров — флоридина и флоретина. Степень торможения для различных объектов может быть неодинаковой. К тому же при сравнительно сильном стимулирующем эффекте оуабайна его тормозящее действие проявляется слабее, как это следует из опыта с влиянием  $1 \cdot 10^{-5} M$  оуабайна.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> *I. Bihler*, *Biochim. et biophys. acta*, v. 163, 3, 401 (1968).    <sup>2</sup> *I. Bihler, P. C. Sawh*, *Biochim. et biophys. acta*, v. 249, 1, 240 (1971).    <sup>3</sup> *P. Q. Kohn, T. Clausen*, *Biochim. et biophys. acta*, v. 225, 3, 277 (1971).    <sup>4</sup> *T. Clausen*, *Cations, Glucose Metabolism and Insulin Action*, Aarhus, Denmark, 1972.    <sup>5</sup> *Д. Б. Зоров, Е. Н. Мохова, Н. Н. Никольский*, В сб.: *Клеточное дыхание в норме и в условиях гипоксии*, Горький, 1973, стр. 12.    <sup>6</sup> *Д. Б. Зоров*, *Механизмы терморегуляторной активации дыхания в мышцах*, Автореф. кандидатской диссертации, М., 1973.    <sup>7</sup> *Н. Н. Никольский*, *Цитология*, т. 15, 3, 310 (1973).    <sup>8</sup> *Н. А. Виноградова, Н. Н. Никольский, А. С. Трошин*, *ДАН*, т. 197, № 5, 1183 (1971).    <sup>9</sup> *Н. А. Виноградова, Н. Н. Никольский, А. С. Трошин*, *Тез. докл. симпоз. Структурная лабильность мембран и ее роль в регуляции функциональной активности клеток*, Минск, 1974, стр. 15.    <sup>10</sup> *A. M. Katz*, *J. Mol. and Cell. Cardiol.*, v. 4, 87 (1972).    <sup>11</sup> *N. G. Nayler*, *Am. J. Physiol.*, v. 225, 4, 918 (1973).