



УДК 577.352.465

УВЕЛИЧЕНИЕ Ca^{2+} -ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАНЫ
САРКОЛЕММАЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ СЕРДЦА КРЫСЫ, НАБЛЮДАЕМОЕ В ПРИСУТСТВИИ АТР
И АДЕНИЛИЛ-(β , γ -ИМИДО)ДИФОСФАТА

Куприянов В. В., Преображенский А. Н., Сакс В. А.

Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва

Везикулярные препараты сарколеммы из миокарда крысы связывают дигитоксигенин больше, чем убаин (соответственно 234 и 33 пмоль/мг), при практически одинаковых константах диссоциации комплексов. Отсюда следует, что не менее чем у 86% везикул ориентация мембраны противоположна клеточной. Выход Ca^{2+} по градиенту его концентрации ($[\text{Ca}^{2+}]_i \approx 2,0$ мМ; $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0,1$ мкМ) из этих везикул ускорился в 1,7 раза после преинкубации их с 0,2 мМ АТР и АДР и в 15 раз после обработки 0,2 мМ аденилил-(β , γ -ими́до)дифосфатом. Ускорение выхода Ca^{2+} коррелировало с увеличением его содержания внутри везикул. Выход Ca^{2+} , стимулированный АТР, подавлялся верапамилом, введенным внутрь везикул, и немонотонно зависел от величины мембранного потенциала, созданного градиентом концентрации K^+ в присутствии валиномицина: при крайних значениях потенциала выход Ca^{2+} замедлялся. Обсуждается механизм регуляции кальцевой проницаемости сарколеммы, основанный на связывании нуклеозидтрифосфатов с компонентами сарколеммальной мембраны.

Сарколемма клеток миокарда играет важную роль в регуляции внутриклеточной концентрации ионов кальция. Один из путей поступления Ca^{2+} в миокардиальные клетки реализуется посредством медленного входящего кальциевого тока, представляющего собой пассивное движение Ca^{2+} по градиенту его концентрации через кальциевые каналы [1, 2]. Этот процесс контролируется энергетическим статусом клетки, т. е. уровнем АТР и фосфокреатина, а также зависит от концентрации сАМР и ряда других факторов [3–6]. Биохимический механизм связи между кальцевой проницаемостью сарколеммы и энергетическим метаболизмом миокарда неизвестен. Среди гипотез, связывающих два этих процесса, наиболее популярна принадлежащая Нидергерке [7] и Сперелакису [3], согласно которой кальциевые каналы активируются вследствие фосфорилирования АТР некоторого их белкового компонента (или компонентов) посредством протеинкиназы чувствительной к сАМР [3, 7, 8]. Удобным объектом для изучения внутриклеточных факторов, влияющих на движение Ca^{2+} через сарколемму, являются сарколеммальные везикулы с ориентацией мембраны, противоположной клеточной (*inside-out*), поскольку в этом случае относительно легко имитировать воздействие на мембрану компонентов цитоплазмы. До сих пор на везикулярных препаратах сарколеммы не было исследовано влияние АТР на пассивное движение Ca^{2+} . Вместе с тем известно, что АТР влияет на связывание Ca^{2+} с везикулами сарколеммы [9–11] и $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмен [12].

В настоящей работе показано, что АТР, АДР и аденилилимидодифосфат ускоряют выход Ca^{2+} по градиенту его концентрации из инвертированных сарколеммальных везикул.

Связывание [^3H]убаина и [^3H]дигитоксигенина с везикулами сарколеммы. Препараты сарколеммы, использованные в данном исследовании, были детально охарактеризованы в наших предыдущих работах [13, 14]. Из данных анализа чувствительности Na , K -АТР-азной активности к убаину и дигитоксигенину следовало, что эти препараты состояли на 80% из везикул с ориентацией мембраны, противоположной клеточной. Принимая во внимание недостаточность этого критерия для определения

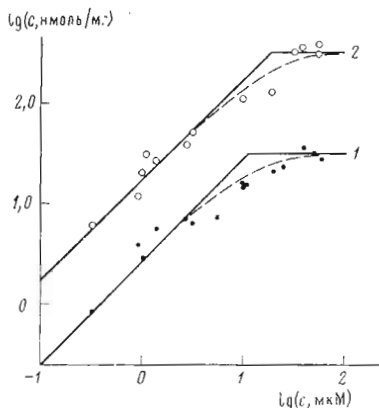


Рис. 1

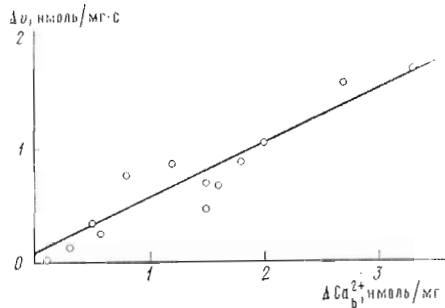


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость количества связанных карденолидов (1 — убаин, 2 — дигитоксигенин) от их концентрации в среде (представлены результаты измерений для трех разных препаратов сарколеммы; время инкубации 10 мин, pH 7,3; 37° С; остальные условия приведены в экспериментальной части)

Рис. 2. Корреляция между ускорением выхода кальция, стимулированным АТР и простым содержанием кальция в везикулах (приведены результаты, полученные с 17 препаратами сарколеммы, характеризовавшихся разными величинами Δv и ΔCa_b^{2+} ; прямая, полученная методом наименьших квадратов, описывается уравнением $\Delta v = 0,08 + 0,46 \Delta Ca_b^{2+}$; $r^2 = 0,53$). Выход Ca^{2+} измеряли за время 2–5 с при pH 7,3 и 37° С

ориентации мембраны, с одной стороны, и разноречивость литературных данных по этому вопросу [14–19] — с другой, мы предприняли попытку установить ориентацию мембраны в везикулах, определяя связывание ими меченых препаратов убаина и дигитоксигенина.

Известно, что Na, K-АТР-аза, как очищенная, так и связанная с клеточной мембраной, способна специфически и достаточно быстро связывать сердечные гликозиды в присутствии АТР + Na^+ + Mg^{2+} или фосфат + Mg^{2+} , способствующих образованию фосфофермента [20, 21]. Мы использовали систему фосфат + Mg^{2+} , так как есть основания полагать, что фосфат в отличие от АТР способен проникать через мембрану везикул сарколеммы. Это чрезвычайно важно при определении ориентации мембраны этих везикул по связыванию с ними карденолидов. Действительно, можно ожидать, что в присутствии АТР, Mg^{2+} и Na^+ гидрофильный убаин, будучи непроникающим через мембрану, свяжется только с везикулами, имеющими разрушенную мембрану, т. е. такими, у которых не только внешняя, но и внутренняя поверхность доступна для убаина, и для АТР. Напротив, интактные везикулы любой ориентации не должны связывать убаин за относительно короткие времена инкубации (около 10 мин), так как необходимым условием быстрого и специфического связывания убаина является одновременное действие гликозида и АТР с противоположных сторон плазматической мембраны. Гидрофобный дигитоксигенин должен, как и убаин, связываться с разрушенными везикулами и, кроме того, с вывернутыми пузырьками (цитоплазматическая сторона мембраны — снаружи). В то же время при использовании фосфата Mg^{2+} , проникающего в везикулы, убаин может связываться также и с правильно ориентированными везикулами, а дигитоксигенин — с везикулами обоих типов.

Таким образом, концентрация центров связывания дигитоксигенина в присутствии фосфата Mg^{2+} дает представление об общем содержании Na, K-АТР-азы в препарате, а концентрация центров связывания убаина в тех же условиях позволяет оценить суммарную долю открытых и правильно ориентированных замкнутых везикул. Наши препараты сарколеммы из сердца крысы в изотонических условиях характеризовались следующими данными о связывании гликозидов:

дигитоксигенин — 234 пмоль/мг; $K_d = 11,2$ мкМ ($r^2 = 0,97$);
 убаин — 32,7 пмоль/мг; $K_d = 9,8$ мкМ ($r^2 = 0,8$).

Влияние АТР и его аналогов на скорость выхода кальция из везикул сарколеммы, его содержание в везикулах и число оборотов центров связывания (37° С, рН 7,3)

Условия	Относительная скорость, v/v_0	Относительное содержание $\frac{^{25}Ca^{2+}}{Ca_b^{2+}}/Ca_b^{2+}, 0$	$\Delta v/\Delta Ca^{2+}$, с ⁻¹	TN = v/Ca^{2+} , с ⁻¹	TN/TN ₀
Контроль	1,0	1,0	—	0,093±0,054 (16)	1,0
0,2 мМ АТР	1,73±0,49 (15)	1,13±0,04 (12)	0,49±0,21 (14)	0,138±0,063 (15)	1,53±0,34 (16)
0,2 мМ АТР + верапами	0,99±0,32 (6)	1,01±0,05 (6)	—	0,093±0,017 (4)	0,99±0,29 (6)
0,2 мМ АТР + 0,2 мМ фосфат	1,79±0,28 (4)	1,04±0,02 (4)	1,03±0,48 (4)	—	1,59±0,45 (5)
0,2 мМ AppNHp	15,0±5,9 (8)	2,3±0,52 (8)	0,42±0,08 (9)	0,259±0,044 (8)	6,4±1,5 (8)
1–2 мкМ A23187	3,43±0,62 (7)	1,17±0,08 (10)	0,68±0,27 (10)	0,13±0,013 (10)	3,05±0,47 (10)

Примечание: В скобках — число определений, как правило равное числу отдельных препаратов сарколеммы. Каждое определение представляет собой среднее из 3–5 измерений, выполненных с одним препаратом. Отношения числа оборотов (TN/TN₀) вычисляли исходя из величин числа оборотов (TN₀), измеренных только для тех препаратов, на которых определялось действие того или иного эффекта.

Из этих данных следует, что для дигитоксигенина число мест связывания в несколько раз больше, чем для убаина, хотя константы диссоциации комплексов в обоих случаях почти одинаковы. Суммарная доля открытых и правильно ориентированных замкнутых везикул равна 14%, что хорошо согласуется с результатами наших энзиматических определений [14]. Логарифмические зависимости количества связанных гликозидов от их концентрации в среде наглядно демонстрируют разницу в связывании дигитоксигенина и убаина (рис. 1). Отношение количества мест связывания дигитоксигенина к Na, K-АТФ-азной активности (~ 180 мкмоль/мг·ч, 30° С) составляет 1,3 пмоль/ед. акт., что довольно близко к величине этого отношения для очищенной Na, K-АТФ-азы, известной из литературы (1,0–3,0 [20, 21]). Отметим также, что найденная нами концентрация мест связывания дигитоксигенина с сарколеммой близка к полученной Джонсом с сотр. при изучении связывания убаина с препаратами сарколеммы в присутствии разрушающего мембрану антибиотика аламетицина (275 пмоль/мг [16]).

Пассивный выход Ca^{2+} из везикул сарколеммы. Преинкубация везикул сарколеммы с MgАТФ (0,2–1,0 мМ, 10 мин, 30° С) перед загрузкой их ионами Ca^{2+} приводила к увеличению содержания этих ионов в везикулах на $13,5 \pm 4,3\%$ и к ускорению их выхода из везикул в 1,7 раза (табл. 1). При этом число оборотов мест связывания Ca^{2+} , определенное как v/Ca^{2+} , также возрастало после обработки АТФ примерно в 1,5 раза.

Напомним, что скорость выхода Ca^{2+} прямо пропорциональна его содержанию в везикулах [14]. Поэтому число оборотов инвариантно содержанию Ca^{2+} . Согласно концепции, развитой нами в работе [14], выход Ca^{2+} из везикул сарколеммы зависит от степени заполнения центров связывания Ca^{2+} , причем из общего числа мест связывания Ca^{2+} лишь некоторые «активные» участвуют в переносе этого иона через мембрану. Поэтому определяемое число оборотов является усредненной величиной. В рамках приведенной гипотезы ускорение выхода Ca^{2+} и увеличение среднего числа оборотов, наблюдаемое при действии АТФ, объясняются либо модификацией существовавших «активных» центров связывания, либо появлением новых «активных» центров. Прирост в скорости выхода Ca^{2+} коррелировал с увеличением содержания Ca^{2+} ; это позволило оценить число оборотов Ca^{2+} для новых мест связывания ($0,49 \pm 0,29$ с⁻¹), которое в 5 раз больше числа оборотов у контрольных препаратов ($0,093 \pm 0,054$ с⁻¹, см. рис. 2). Кроме того, было обнаружено, что преинкубация с АТФ не приводила к существенным изменениям величины K_d для Ca^{2+} , а также величины K_m , характеризующей выход кальция из везикул. Верапамил, введенный внутрь везикул путем добавления его в среду гомогенизации (0,1 мМ), практически полностью подавлял выход Ca^{2+} , стимулированный АТФ (см. табл. 1). Выход Ca^{2+} , стимулированный АТФ, зависел от разности электрического потенциала, созданной трансмембранным градиентом концентрации K^+ в присутствии валиномицина. Таблица 2. показывает влияние мембранного потенциала на относительное увеличение скорости выхода Ca^{2+} из везикул, вызванное АТФ. Стимулирующее действие АТФ было максимально в отсутствие разности потенциалов и практически не проявлялось при разности потенциалов любого знака. Немонотонный характер зависимости скорости выхода от разности потенциалов может указывать на участие в этом процессе чувствительных к потенциалу ионных каналов, которые активируются АТФ. К сожалению, измеренные скорости выхода Ca^{2+} не могут быть прямо соотнесены со значениями мембранного потенциала, так как последний изменяется во времени по мере уменьшения градиента концентрации K^+ . Скорость выхода Ca^{2+} в контрольных препаратах (преинкубация без АТФ) практически не зависела от мембранного потенциала (табл. 2). Было бы заманчиво объяснить обнаруженный нами эффект АТФ тем, что некоторые белковые компоненты сарколеммы фосфорилируются присутствующей в наших препаратах мембранной протеинкиназой. Действительно, в подобных препаратах наблюдалось эндогенное фосфорилирование низкомолекулярного белка сарколеммы с молекулярной массой 11500 Да, причем образовавшийся фосфобелок был

Зависимость относительного ускорения выхода кальция из везикул, стимулированного АТР, и относительной скорости выхода кальция без АТР от знака мембранного потенциала
Средние данные для 5 препаратов

Отношение концентрации K^+ внутри везикул к его концентрации во внешней среде * $[K^+]_i/[K^+]_o$	0,04 (-)	0	25 (+)
Относительное увеличение скорости выхода Ca^{2+} под действием АТР, $\Delta v/v^{**}$	0,10±0,19	0,52±0,20	0,028±0,022
Относительная скорость выхода Ca^{2+} в отсутствие АТР***, v/v_0	1,17±0,08	1,0	1,24±0,26

* (-) и (+) обозначают знак мембранного потенциала снаружи везикул.

** $\Delta v = v_{\text{АТР}} - v$, где $v_{\text{АТР}}$ и v — скорости выхода Ca^{2+} из везикул, обработанных и необработанных АТР.

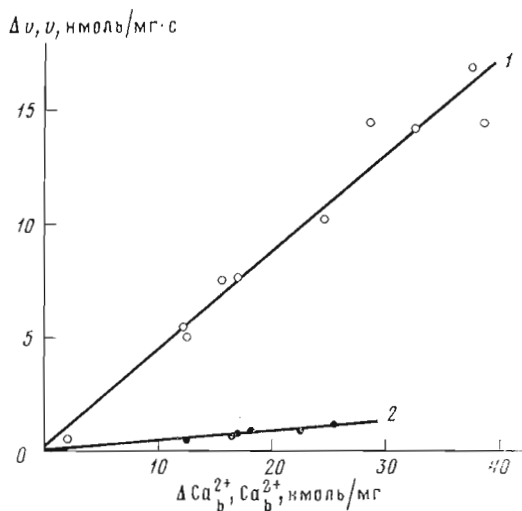
*** v_0 — скорость выхода Ca^{2+} при нулевой разности потенциалов в отсутствие АТР.

устойчив [13]. Отметим, что ускорение выхода Ca^{2+} под действием АТР не было связано с выбросом последнего из правильно ориентированных везикул с помощью Ca^{2+} -АТР-азы, так как, во-первых, АТР не проникает внутрь интактных везикул, а во-вторых, весь АТР (0,2 мМ), добавленный к суспензии плазматических мембран (2–5 мг/мл), гидролизировался за 10 мин инкубации при 30° С. Иными словами, выход Ca^{2+} из везикул регистрировался в присутствии смеси АДФ и фосфата. В отдельных опытах было показано, что АДФ как в присутствии, так и в отсутствие фосфата вызывает точно такое же ускорение выхода Ca^{2+} , как и АТР (см. табл. 1). Поскольку препараты сарколеммы обладали некоторой аденилаткиназной активностью, можно было допустить, что небольшое количество АТР, достаточное для фосфорилирования сарколеммальных белков, образуется в результате аденилаткиназной реакции из АДФ. Однако введение избытка гексокиназы (10–20 МЕ/мл) и глюкозы (20 мМ) в среду инкубации не подавляет эффект АДФ. Для разрешения возникшего вопроса мы использовали негидролизруемый аналог АТР, аденилил-(β, γ -имидо)дифосфат (АppNHp). Взятое в той же концентрации, что и АТР (0,2 мМ), это соединение вызывало увеличение везикулярного содержания кальция в 2–3 раза, увеличение скорости его выхода в 15 раз и возрастание среднего числа оборотов мест связывания Ca^{2+} в 6 раз (табл. 1). Это может означать, что новые места связывания Ca^{2+} , появившиеся в результате действия АppNHp, характеризуются большим числом оборотов ($\Delta v/\Delta Ca^{2+}$), чем места связывания в контрольных препаратах. Действительно, между приростом скорости выхода Ca^{2+} и увеличением его содержания в везикулах наблюдалась хорошая корреляция ($r^2=0,95$, рис. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что число оборотов новых мест связывания, появившихся при действии АppNHp ($TN=0,43 \text{ с}^{-1}$), было близко к аналогичной величине, найденной для АТР ($TN=0,49 \text{ с}^{-1}$; см. рис. 1 и табл. 1).

Эффект АppNHp не был связан с действием сАМР, вероятно возникавшего из АppNHp в аденилатциклазной реакции, так как сАМР сам по себе или в сочетании с АТР в концентрациях 10 и 200 мкМ не приводит к такой стимуляции выхода Ca^{2+} из везикул, как АppNHp. Кроме того, действие АppNHp не может быть объяснено только наличием в нем примесей АТР и АДФ, так как последние вещества в тех же концентрациях производили гораздо меньшее стимулирующее действие на выход Ca^{2+} из везикул по сравнению АppNHp (см. табл. 2). Поскольку содержание АТР и АДФ в АppNHp не превышало 1% (мол. %), концентрация АТР и АДФ в среде инкубации не превосходила 2 мкМ. Дополнительные эксперименты покажут, можно ли полностью исключить возможность того, что активирующее действие АppNHp проявляется или усиливается в присутствии АТР.

Изучение связывания [3H]уабаина и [3H]дигитоксигенина с мембраной сарколеммальных везикул, выполненное в настоящей работе, подтвер-

Рис. 3. Корреляция между ускорением выхода кальция стимулированным ArrNHp и приростом содержания кальция в везикулах (1) (приведены данные для шести препаратов сарколеммы; $\Delta v = 0,21 + 0,43 \Delta Ca_B^{2+}$; $r^2 = 0,95$). Прямая 2 представляет зависимость скорости выхода Ca^{2+} от его внутривезикулярного содержания в отсутствие ArrNHp ($\Delta v = -0,23 + 0,53 \Delta Ca_B^{2+}$; $r^2 = 0,94$). Выход Ca^{2+} измеряли за 2 с при pH 7,3 и 37° C



димо сделанное нами ранее заключение о том, что эти везикулы характеризуются преимущественной ориентацией мембраны, противоположной клеточной [14]. Из анализа этих данных следует также, что связывание уабанина с сарколеммальными везикулами в отсутствие и в присутствии детергента, часто используемое для определения ориентации мембраны [15, 16], не всегда правильно интерпретируется авторами. Действительно, в отсутствие детергента уабанин может взаимодействовать (в присутствии АТР) только с открытыми везикулами. Поэтому число центров связывания уабанина не может служить мерой содержания правильно ориентированных везикул. При добавлении детергента как правильно ориентированные, так и вывернутые замкнутые пузырьки становятся проницаемыми для гликозида и АТР; это позволяет определить общее число центров связывания уабанина с мембраной, но не ориентацию последней. В связи с этим данные о связывании гликозидов использовались в сочетании с результатами анализа энзиматических активностей [16]. Более адекватным для этой цели является использование вместо АТР фосфата, который проникает через мембрану. Совместное применение двух эффекторов — непроницающего уабанина и проникающего дигитоксигенина в присутствии фосфата для определения ориентации мембраны сарколеммальных везикул, которое было использовано в нашей работе, позволяет избежать перечисленных выше трудностей.

Выход кальция из сарколеммальных везикул стимулировался АТР, АДФ и аденилилимидофосфатом. При этом увеличение скорости выхода кальция коррелировало с повышением его внутривезикулярного содержания (рис. 2 и 3). Как уже отмечалось выше, это может означать, что аденилилимидофосфат каким-то образом увеличивает число таких мест связывания Ca^{2+} с мембраной, которые характеризуются высоким числом оборотов. Данный эффект формально сходен с действием кальциевого понофора А23187, который, как было показано в нашей предыдущей работе, также сильно ускорял выход кальция из сарколеммальных везикул, незначительно увеличивая его содержание [14]. Если механизм активирующего действия перечисленных нуклеотидов одинаков, то следует предположить, что он не связан с фосфорилированием сарколеммальных белков. Возможный механизм действия этих веществ может состоять в том, что их связывание с некоторыми компонентами сарколеммы сопровождается увеличением ее кальциевой проницаемости. Конечно, такой механизм не исключает возможности регуляции кальциевой проницаемости сарколеммы путем фосфорилирования ее белков, как это предполагается в работах [3, 4, 7, 8]. Действительно, нельзя полностью исключить, что белки сарколеммы фосфорилируются присутствующими в ArrNHp минорными примесями АТР, концентрация которых в условиях наших экспериментов не превышала

2 мкМ, т. е. менее 1 нмоль/мг белка. Далее можно допустить, что для проявления активирующего действия ArrNHr необходимо фосфорилирование некоторых сарколеммальных белков. Однако для более определенного ответа на этот вопрос необходимы дополнительные эксперименты.

Поскольку выход Ca^{2+} из везикул сарколеммы, стимулированный АТР, ингибировался верапамилом и немонокотонно зависел от мембранного потенциала, возможно, что по своему механизму этот выход сходен с переносом ионов через кальциевые каналы. Если это действительно так, то можно предложить гипотетический механизм активации этих каналов, включающий в себя связывание АТР или других трифосфатов с сарколеммальной мембраной. В этой связи следует упомянуть работу Атсуко с сотр. [22], в которой было обнаружено, что АТР, GTP и аденилилимидо-дифосфат способны увеличивать медленный входящий Ca^{2+} -ток в клетках миокарда лягушки [22].

Стимулирующее действие АТР на связывание Ca^{2+} сарколеммальной мембраной наблюдалось и ранее [9–11]. Однако из этих работ неясно, о каком процессе идет речь: о действительном накоплении Ca^{2+} поверхностно мембраны или же о его АТР-зависимом накоплении внутри везикул, осуществляемом Ca^{2+} -АТР-азой [9–11]. Было обнаружено также, что верапамил частично ингибирует пассивное и АТР-зависимое связывание Ca^{2+} препаратами сарколеммы [11]. Перечисленные эффекты АТР и верапамила на связывание кальция, по-видимому, аналогичны тем, которые наблюдались в этой работе.

Экспериментальная часть

Выделение препаратов сарколеммы, определение энзиматических активностей, а также измерение пассивного выхода Ca^{2+} из везикул проводили согласно работам [13, 14].

Измерения связывания $[^3\text{H}]$ уабаина и $[^3\text{H}]$ дигитоксигенина с препаратами сарколеммы. Специфическое связывание карденолидов измеряли по модифицированным методикам, описанным в работах [21, 23, 24]. Везикулы сарколеммы (1–2 мг белка/мл) инкубировали 10 мин (37°C) с $[^3\text{H}]$ уабаином и $[^3\text{H}]$ дигитоксигенином (0,3–100 мкМ) в среде, содержащей 20 мМ имидазол- HCl (рН 7,3), 0,3 М сахарозу, 3–4 мМ MgCl_2 и 2–3 мМ фосфат натрия (рН 7,3). Для оценки неспецифического связывания гликозидов использовали везикулы, инкубированные в тех же условиях, в среде, содержащей вместо фосфата 5 мМ немеченого уабаина. Через 10 мин из инкубационной смеси отбирали пробы (50 мкл), разбавляли их прямо на фильтре в 10 раз холодным буферным раствором, содержащим 20 мМ имидазол- HCl (рН 7,3) и 5 мМ немеченый уабаин, после чего быстро фильтровали. Фильтры промывали дважды буферным раствором (0,5 мл) и, поместив во флакон со сцинтиллятором Брэя, определяли радиоактивность. Содержание гликозидов, специфически связанных с сарколеммой, находили из разности радиоактивностей, определенных в двух опытах: одного с фосфатом натрия и другого — с немеченым уабаином. Каждое измерение содержания связанного карденолида при данной его концентрации повторяли от 3 до 9 раз с одним и тем же препаратом сарколеммы. Удельная радиоактивность $[^3\text{H}]$ уабаина в среде инкубации составляла 0,5–50 Ки/ммоль $[^3\text{H}]$ дигитоксигенина — от 20 мКи до 6 Ки на 1 ммоль.

Влияние АТР и его аналогов. К концентрированной суспензии сарколеммальных везикул (2–5 мг/мл) в среде, содержавшей 20 мМ имидазол- HCl (рН 7,3), 0,3 М сахарозу, 20–100 мМ KCl , 0,3 мМ дитиотреит, 2,0 мМ MgCl_2 и 2–4 мкг/мл валиномицина, добавляли АТР, ADP или ArrNHr (0,2 мМ) или же 10 мкМ сАМР и инкубировали 10 мин при 30°C . Затем пробы охлаждали на льду и вносили $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,5–8,0 мМ). После достижения равновесия измеряли выход Ca^{2+} по стандартной методике [14].

В экспериментах по изучению влияния мембранного потенциала на скорость выхода Ca^{2+} для создания отрицательного по отношению к внутреннему объему потенциала создавали внутривезикулярную концентрацию

ионов калия, меньшую, чем наружная, путем замены K^+ на Li^+ . Положительный потенциал создавали разбавлением суспензии везикул, нагруженных K^+ (100 мМ), средой, в которой KCl полностью или частично был заменен на эквимольные количества холин-Cl или LiCl.

В работе использовали ферменты, нуклеотиды, сахарозу, дитиотреит, валиномицин, EGTA (Sigma, США), аденилил-(β , γ -имидо)дифосфат $4Li$ и убаин (Serva, ФРГ), имидазол (Merck, ФРГ), $^{45}CaCl_2$ с удельной радиоактивностью 1,7 Ки/ммоль и [$G-^3H$]убаин (49 Ки/ммоль) (Amersham, Англия). Дигитоксигенин и [3H]дигитоксигенин с удельной радиоактивностью 6 Ки/ммоль были любезно предоставлены д-ром Р. Гроссе (Центральный институт молекулярной биологии, Берлин—Бух, ГДР). Соли имели квалификацию х.ч. или ос.ч. Фильтрация осуществлялась через фильтры типа HA (Millipore, США) с диаметром пор 0,45 мкм и внешним диаметром 12 мм. Спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометре DW 2 UV/VIS (Aminco, США), а радиоактивность образцов определяли в сцинтилляторе Брэя на счетчике MarkIII (США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Reuter H. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1973, v. 26, p. 3–43.
2. Langer G. A. *Ann. Rev. Physiol.*, 1973, v. 35, p. 55–86.
3. Sperelakis N., Schneider J. A. *Amer. J. Cardiol.*, 1976, v. 37, p. 1079–1085.
4. Reuter H., Scholz H. J. *Physiol.*, 1977, v. 264, p. 49–62.
5. Tsien R. W., Giles W., Greengard P. *Nature, New Biol.*, 1972, v. 240, p. 181–183.
6. Rosenshtraukh L. V., Saks V. A., Yuriavichus I. A., Nesterenko V. V., Undrovinas A. I., Smirnov V. N., Chazov E. I. *Biochem. Med.*, 1979, v. 21, p. 1–15.
7. Niedergerke R., Ogden D. C., Page S. In: *Calcium Biol. Syst. 30 Symp. Soc. Exp. Biol.*, Englefield Green, 1975. Cambridge, 1976, p. 381–395.
8. Williamson J. R., Schaffer S. In: *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*/Eds Roy P.-E., Dhalla N. S. Baltimore: University Park Press, 1976, v. 9, p. 205–223.
9. Mas-Oliva J., Williams A. J., Nayler W. G. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 87, p. 441–447.
10. Morcos N. C., Jacobson A. L. *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, 1979, v. 57, p. 529–534.
11. Nayler W. G., Mas-Oliva J., Williams A. J. *Circ. Res.*, 1980, v. 46, suppl. 1, p. 161–166.
12. Reinlib L., Caroni P., Carafoli E. *FEBS Lett.*, 1981, v. 126, p. 74–76.
13. Преображенский А. Н., Сакс В. А. *Биохимия*, 1981, т. 46, с. 1681–1693.
14. Куприянов В. В., Преображенский А. Н., Сакс В. А. *Биохимия*, 1981, т. 46, с. 1863–1879.
15. Bers D. M., Philipson K. D., Nishimoto A. Y. *Biochim. and biophys. acta*, 1980, v. 601, p. 358–371.
16. Jones L. R., Maddock S. W., Besch H. R., Jr. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, p. 9971–9980.
17. Lullman H., Peters T. In: *Recent advances in studies cardiac structure and metabolism*/Eds Roy P.-E., Dhalla N. S. Baltimore: University Park Press, v. 9, p. 311–328.
18. Grosse R., Spitzer E., Kupriyanov V. V., Saks V. A., Repke K. R. H. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 603, p. 142–156.
19. Mas-Oliva J., Williams A. J., Nayler W. G. *Anal. Biochem.*, 1980, v. 103, p. 222–226.
20. Schwartz A., Nagano K., Nakao M., Lindenmayer G. E., Allen J. C., Matsui H. In: *Methods in Pharmacology*/Ed. Schwartz A. Meridith Corporation, 1971, v. 1, p. 361–388.
21. Stekhoven F. S., Bonting S. L. *Physiol. Rev.*, 1981, v. 61, p. 1–76.
22. Atsuko Y., Masayosi G., Yasuo T. *Jap. J. Physiol.*, 1978, v. 28, p. 47–61.
23. Pitts B. J. R., Wallick E. T., van Winkle W. B., Allen J. C., Schwartz A. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, v. 184, p. 431–440.
24. Wallick E. T., Pitts B. J. R., Lane L. K., Schwartz A. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1980, v. 202, p. 442–449.

Поступила в редакцию

3.III.1982

После доработки

1.VI.1982

INCREASE IN Ca^{2+} -PERMEABILITY OF SARCOLEMMAL VESICLE MEMBRANES
FROM RAT HEARTS IN THE PRESENCE OF ATP AND ADENYLYL-(β , γ -IMIDO)-
DIPHOSPHATE

KUPRIYANOV V. V., PREOBRAZHENSKY A. N., SAKS V. A.

*All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow*

Vesicular sarcolemmal preparations isolated from rat myocardium bind more digi-
toxinigenin than ouabain (234 and 33 pmol/mg, respectively), the dissociation constants
for both substances being virtually equal. This suggests that the inside-out vesicles
account for more than 80%. Calcium efflux along its concentration gradient ($[\text{Ca}^{2+}]_i =$
 $= 2 \text{ mM}$, $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0.1 \text{ }\mu\text{M}$) from these vesicles was stimulated 1.7-fold by preincu-
bation with ATP and ADP, and 15-fold – with adenylyl-(β , γ -imido)diphosphate. The
increase in the Ca^{2+} efflux rate correlated with the rise of vesicular Ca^{2+} content.
ATP-stimulated Ca^{2+} efflux was suppressed by verapamil introduced into vesicles and
revealed nonmonotonous dependence on the membrane potential across the sarcolemmal
membrane created by potassium ions and valinomycin; at extreme potential values the
 Ca^{2+} efflux was inhibited. A possible mechanism for regulation of sarcolemmal per-
meability for Ca^{2+} based on nucleoside triphosphate binding with sarcolemma is dis-
cussed.