

[А. В. Богатский], Н. Г. Лукьяненко, В. Г. Вонгай,
Т. А. Савенко, И. П. Цымбал, Е. И. Назаров

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ 15-КРАУН-5 НА МЕМБРАНЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

В литературе описано действие краун-эфиров и родственных им соединений на клетки разного уровня организации, их органеллы и модельные мембраны [3, 13, 14]. При фармакологических испытаниях одного из краун-эфиров — 15-краун-5 (15-к-5) на животных была обнаружена оксотреморин-подобная активность [11]. Был обнаружен также ряд эффектов 15-к-5 на изолированные органы [11], которые, на наш взгляд, не могут быть объяснены М-холиномиметической активностью соединения. Кроме того, в структуре 15-к-5 отсутствуют химические группы, характерные для холинореактивных соединений, что делает маловероятным его прямое взаимодействие с холинорецептором. Ряд проявлений физиологической активности 15-к-5, отмеченных в литературе [11], опосредовался гладкомышечной мускулатурой. Целью настоящей работы является изучение особенностей взаимодействия 15-к-5 с гладкомышечными клетками (ГМК), а также модельными липидными мембранами.

Методика. Влияние циклополиэфира на электрические характеристики ГМК слепой кишки морской свинки и легочной артерии крысы изучали по [2]. Измерения проводили в стандартном растворе Кребса. Сократительную активность полосок артерий и кольцевых мышц слепой кишки (*Cecum*) исследовали с помощью механотронного преобразователя 6 МХ1С. Бимолекулярные липидные мембраны (БЛМ) готовили из раствора фосфатидилхолина (*Serva*) в декане (40 мг/мл) на отверстиях тefлонового стаканчика в среде состава: 100 ммоль KCl, 5 ммоль трис-Cl, pH — 7,2. Амфотерицин Б вводили в измерительную ячейку в концентрации 10^{-7} моль. Поверхностный потенциал БЛМ измеряли потенциодинамическим методом [1]. Проводимость БЛМ, модифицированной амфотерицином Б, измеряли в условиях фиксации потенциала. Скорость дыхания митохондрий измеряли полярографическим методом [5].

Результаты и обсуждение. Сравнение действия 15-к-5 на скелетные и гладкие мышцы показало, что последние гораздо более чувствительны к краун-эфиру. Так, 15-к-5 в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ моль не влиял на силу сокращений диафрагмы крысы при электрической стимуляции *nerous frenicus* или аппликации ацетилхолина. ЕД₅₀ 15-к-5 для подавления сокращений полосок *Cecum*, вызванных ацетилхолином и гистамином, составило 0,87 и 0,97 ммоль соответственно (рис. 1, В). Из рис. 1, А видно, что краун-эфир подавляет как сократительный ответ на ацетилхолин, так и спонтанную механическую активность ГМК. Ингибирование 15-к-5 сократительного ответа на гистамин смешанного типа (рис. 2) носит преимущественно неконкурентный характер (константа неконкурентного ингибирования $k_i = 1,3 \cdot 10^{-3}$ моль, конкурентного — $k_i = 4 \cdot 10^{-4}$ моль). Доказательство того, что 15-к-5 не взаимодействует с узнающими участками рецепторов хемовозбудимой мембраны ГМК, было получено в опытах по изучению влияния краун-эфира на индуцированные медиаторами изменения мембранного потенциала клеток *Cecum*. Оказалось, что 15-к-5 в концентрации до 5 ммоль не изменяет амплитуды деполяризационных ответов на ацетилхолин (рис. 1, Б) и гистамин и гиперполяризационных на АТФ (10^{-3} моль) и адреналин ($5 \cdot 10^{-5}$ моль). В больших концентрациях (более 5 ммоль) 15-к-5 способен вызывать деполяризацию ГМК *Cecum*. Деполяризация сопровождается обратимым увеличением сопротивления мембраны ГМК в 1,5—2 раза. Учитывая, что мембранный потенциал покоя ГМК образуется пассивными утечками ионов натрия и калия, мы сделали вывод, что деполяризующее действие 15-к-5 объясняется блокированием калиевых

Поступила 14.07.83

каналов. Параметры потенциалов действия и спонтанной синаптической активности не изменялись под действием 15-к-5. Известно, что сокращению гладких мышц под действием медиаторов предшествует увеличение натрий-калиевой проницаемости, деполяризующее мембрану до уровня, при котором активируются «быстрые» потенциалозависимые натрий-кальциевые токи [8]. Исходя из неизменности перечисленных видов про-

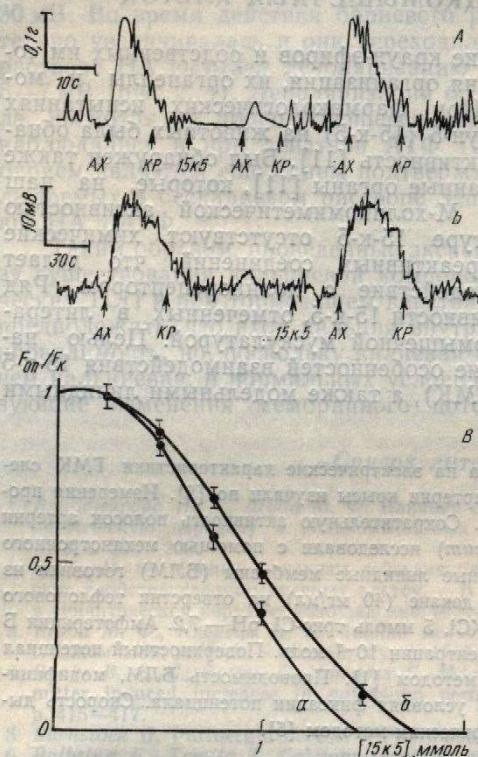


Рис. 1. Действие 15-к-5 на электрическую и механическую активность гладких мышц слепой кишки.

А, Б — влияние 15-к-5 на сократительный и деполяризационный ответ ГМК слепой кишки на ацетилхолин. В — концентрационная зависимость степени подавления сокращений гладких мышц, вызываемых ацетилхолином (а) и гистамином (б). По горизонтали — концентрация 15-к-5 в ммоль, по вертикали — отношение силы сокращений в опыте ($F_{оп}$) к контрольной ($F_{к}$).

Рис. 2. Действие 15-к-5 (1 ммоль) на индуцируемые гистамином сокращения гладких мышц.

По горизонтали — величина, обратная концентрации гистамина в моль·10⁻⁵, по вертикали — величина, обратная отношению амплитуды сокращений при этих концентрациях к амплитуде сокращения, вызванного максимальной концентрацией гистамина. а — опыт, б — контроль.

влияния 15-к-5, проникшего внутрь ГМК, на механизм энергозависимого сокращения свидетельствуют два факта. Во-первых, краун-эфир не снимает сокращения полосок легочной артерии крысы, индуцированного норадреналином ($5,9 \cdot 10^{-8}$ моль). Норадреналин в ГМК легочной артерии вызывает освобождение внутриклеточного кальция [15]. Во-вторых, 15-к-5 вызывает сокращение ГМК *Taenia coli*, которое полностью и обратимо подавляется верапамилом (10^{-6} моль). Сокращение и деполяризация мембраны ГМК *Taenia coli* под действием 15-к-5 частично (на 65 %) подавляется антагонистом гистамина димедролом в концентрации $3,4 \cdot 10^{-5}$ моль. Кроме того, 15-к-5 не вызывает дополнительного сокращения и деполяризации на фоне уже развившегося ответа на гистамин. Деполяризующий эффект 15-к-5 не снимается атропином, фентоламином и верапамилом. Показано, что 15-к-5 также вызывает сокращение подвздошной кишки морской свинки [11]. Известно, что гистамин является медиатором воспаления [4, 7]. Вероятно, отмеченное выше гистами-

ноподобное действие воспалительного действия с гистамином кальций не играет. Следовательно, под действием КС1 при отсутствии на деполяризацию ГМК на это свидетельствует об отсутствии взаимодействия каналами медленными аллельными и с ацетилхолиновыми новыми рецепторами, но не натриевыми каналами матических мембран.

Возможность действия молекулярных ионных каналов продемонстрирована на примере БЛМ, модифицированной амфотерицином В. Краун-эфир в

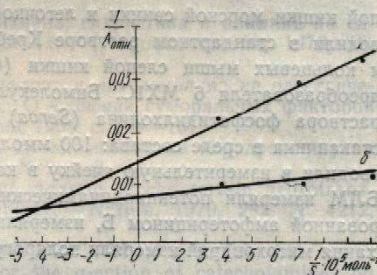
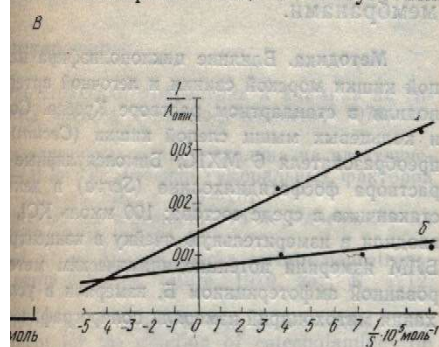


Рис. 3. Влияние 15-к-5 на свойства мембран.

А — изменение проводимости модифицированной амфотерицином В мембраны 15-к-5. Б — зависимость потенциала БЛМ от концентрации 15-к-5 (б). По вертикали — величина, обратная значению потенциала БЛМ.

ции $5 \cdot 10^{-4}$ моль полиеновым антибиотиком поверхностного натяжения, что краун-эфир не имеет свойств бислоя. Та же ванная БЛМ не имеет пор амфотерицином. Согласно имеющимся данным, содержит восемь катионов на поверхность, что обнаружено в расчете образования диметрических комплексов стрикционных изометрических потенциал, индуцированный кальций связанный мембран будимых мембран вытеснение или экстракцией 15-к-5 мольцепторами ацетилхолина медиатора и денция в объяснении эфиров, исходящая

действия и спонтанной синаптической активности 15-к-5. Известно, что сокращение медиаторов предшествует увеличению деполяризующее мембрану до уровня, «рые» потенциалзависимые натрий-изменности перечисленных видов проницаемости в присутствии 15-к-5, мы заключаем, что краун-эфир не взаимодействует с соответствующими ионными каналами проницаемости. 15-к-5 в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль наполовину подавляет сокращение но не Na-K зависимую деполяризацию ГМК *Sesum*, вызванную увеличением концентрации KCl в растворе Кребса до 40 ммоль, что свидетельствует о подавлении медленной потенциалзависимой кальцевой проницаемости мембран ГМК. Об отсутствии



и механическую активность гладких мышц и кишки.

Яризационный ответ ГМК слепой кишки на ацетилин подавления сокращений гладких мышц, вызываю горизонтально — концентрация 15-к-5 в ммоль, по ний в опыте ($F_{\text{оп}}$) к контрольной ($F_{\text{к}}$).

дуцируемые гистамином сокращения гладких мышц.

ции гистамина в моль $\cdot 10^{-5}$, по вертикали — великий при этих концентрациях к амплитуде сокращения гистамина. α — опыт, β — контроль.

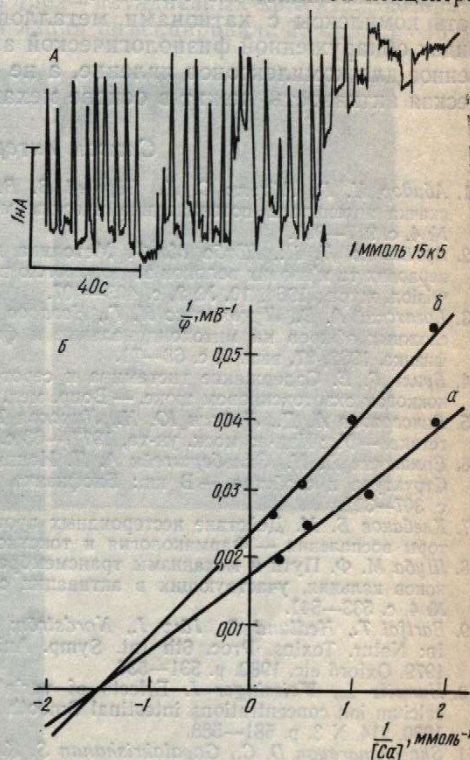
ГМК, на механизм энергозависимого факта. Во-первых, краун-эфир не ной артерии крысы, индуцированного орадреналин в ГМК легочной арте-клеточного кальция [15]. Во-вторых, *Taenia coli*, которое полностью и об- 10^{-6} моль). Сокращение и деполяри-под действием 15-к-5 частично (на гистамина димедролом в концентра-к-5 не вызывает дополнительного со-уже развившегося ответа на гиста-5 не снимается атропином, фентола-о 15-к-5 также вызывает сокращение и [11]. Известно, что гистамин явля-Вероятно, отмеченное выше гистами-

ноподобное действие на *Taenia coli*, а также подавляемый димедролом воспалительный эффект краун-эфира [11] объясняются его взаимодействием с гистаминовым рецептором. Внутриклеточно депонированный кальций не играет решающей роли в сокращении гладких мышц [10, 12]. Следовательно, подавление краун-эфиром сокращений гладких мышц *Sesum*, вызванных ацетилхолином, гистамином или повышенной концентрацией KCl при отсутствии влияния на деполяризационную реакцию ГМК на эти же агенты, свидетельствует об избирательном взаимодействии 15-к-5 с каналами медленных потенциалзависимых и связанных с ацетилхолиновыми и гистаминовыми рецепторами кальцевыми, но не натриевыми и кальцевыми каналами экзоплазматических мембран.

Возможность прямого воздействия молекул 15-к-5 на ионные каналы была продемонстрирована нами на примере БЛМ, модифицированной амфотерицином Б. Исследуемый краун-эфир в concentra-

Рис. 3. Влияние 15-к-5 на электрические параметры БЛМ.

А — изменение проводимости БЛМ, модифицированной амфотерицином Б, под действием 15-к-5. Б — зависимость поверхностного потенциала БЛМ от концентрации ионов кальция в контроле (α) и в присутствии 1 ммоль 15-к-5 (β). По горизонтали — величина, обратная концентрации ионов кальция в ммоль, по вертикали — величина, обратная значению поверхностного потенциала БЛМ.



ции $5 \cdot 10^{-4}$ моль подавляет проводимость БЛМ, модифицированной полиеновым антибиотиком (рис. 3, А). Оценка нормальной компоненты поверхностного натяжения БЛМ электрострикционным методом показала, что краун-эфир в концентрации до 5 ммоль не изменяет механических свойств бислоя. Таким образом, снижение проводимости модифицированной БЛМ не может быть объяснено снижением подвижности полупор амфотерициновых каналов, а следовательно — уменьшением вероятности образования трансмембранных пор полиенового антибиотика. Согласно имеющимся представлениям устье амфотерицинового канала содержит восемь карбоксильных групп, образующих кольцевую структуру на поверхности мембраны [6]. Исходя из этого можно предположить, что обнаруженное снижение проводимости БЛМ происходит за счет образования двойных комплексов (15-к-5-катион-структурно согласованный комплексон — устье амфотерицинового канала). Электрострикционные измерения показали, что 15-к-5 снижает поверхностный потенциал, индуцированный ионами кальция (рис. 3, Б). Мембраносвязанный кальций играет важную роль в функционировании хемовозбудимых мембран ГМК [8]. Исходя из этого можно предположить, что вытеснение или экранирование мембраносвязанных ионов кальция молекулами 15-к-5 может опосредовать взаимодействие краун-эфира с рецепторами ацетилхолина и гистамина на участке между местом связывания медиатора и кальцевым ионофором канала. Существует тенденция в объяснении механизма физиологической активности краун-эфиров, исходящая из наличия у них ионофорных свойств [13, 14].