ВЛИЯНИЕ НА ГЛАДУВАНЕТО И ХОЛЕСТЕРОЛОВОТО НАТОВАРВАНЕ ВЪРХУ ТРАНСПОРТА НА КАЛЦИЕВИТЕ ЙОНИ ПРЕЗ САРКОЛЕМНА МЕМБРАНА

ОЛГА ПЕТКОВА,К.С.Н.,ДОЦЕНТ +,ГЕОРГИ УЗУНОВ К.Б.Н.,ДОЦЕНТ+, ВИЗВМ
НИЧО ИВАНОВ,З.Д.Н. ПРОФ.Д-Р++,ПЕНКА ПОПОВА,К.Б.Н.++ ИБИРРО,БАН

Значимостта на транспорта на калциевите йони през сарколемната мембрана при процесите на енергизация на мускулните влакна е проблем,който е актуален в много аспекти(3,21).Прецизирането на ролята на редица фактори за повлияване на мембранния транспорт на калциевите йони е все още насока,в която експерименталните разработки са недостатъчни.Голям интерес в този аспект представлява модулирането на калциевия транспорт през мускулните мембрани при експериментални условия- дефицит на протеин и холестеролово натоварване.В литературата има съобщения за ролята на белтъците и липидите в регулацията на транспорта на Ca^{++} през биологични мембрани(1,10,15,22).

Трансмембранният транспорт на Ca^{++} е непосредствено свързан с изразходване на АТФ, постоянния ресинтез на който се обезпечава преди всичко по пътя на трансфосфорилиране на АДФ чрез креатинфосфат,реакция катализирана от креатинфосфокиназата, обезпечаваща изключително бърз ресинтез на АТФ.В този аспект при проследяване транс мембранния транспорт на калциеви йони бяха маркирани при отделните опити нивата на АТФ-азната и креатинфосфокиназната активност свързани сн енергообезпечаване на процесите на транспорта на калциевите йони.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията бяха проведени с мъжки плъхове линия Wistar върху мускул Extensor Digitorum Longus в следните варианти:при експеримент 1 а, б и в се използуваха растящи плъхчета(11бр) с тегло 37 г подложени на 48-часово гладуване с постоянен достъп до вода.Контролните животни получаваха стандартна по състав за този вид животни гранулирана смеска.Всички условия на отглеждане бяха максимално стандартизирани.След декапитиране на животните веднага бяха хирургически отпрепарирани интактни двата мускула E. D. L. Определена бе АТФ-азната активност в пресен хомогенат по метода на Recknagel and Lombardi (20).АТФ-азната активност се измерваше по нарастването на неорганичния фосфор(Фн) в инкубационната среда по метода на Fiske a. Subbarow (11).Креатинфосфокиназната активност бе определена по метода на Kuhler et al (17) в модификация на Гринио и Консисторум (2).Стойностите на ензимните активности се стандартизираха спрямо концентрацията на белтъка,определян по метода на Lowry (14).Методите за определяне на efflux транспорта на калциевите йони са подробно описани в публикациите на Kohn a. Clausen (12) Chiner et al (8) и Clausen et al (9).През време на целия експеримент мускулите бяха постоянно аерирани с O_2.

Експеримент 2 а, б, и в се проведе със завършили растежа си полово зрели мъжки плъхове(12 броя) с тегло 110 г.Постановката на опита е както при експеримент 1 а,б и в.

В експеримент 3 а, б и в бяха включени 12 броя растящи мъжки плъхчета(41-44г) Опитните животни бяха подложени на холестеролово натоварване чрез аплициране на алкохолен радтворна холестерол(5% w/w), 16 часа преди декапитирането .

Експеримент 4 а, б и в, при който се използуваха мъжки плъхове(10 броя) с тегло 60-70 г при по-продължително холестеролово натоварване чрез включване на холестерола 5% към дажбата на животните в продължение на 6 дни.Ретенцията на ^{45}Ca в мускул E. D. L. по време на инкубирането и степенното промиване на мускулите в продължение на 150 мин. в нерадиоактивен Кребс-Рингеров бикарбонатен буфер бе измервана с радиометрична установка от едноканален анализатор VA - V100 и брояч VA-G -120.

Статистическата обработка на получените експериментални данни бе извършена по метода на Плохинский (6).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Фиг. 1 а, б и в отразяват получените резултати за АТФ-азната активност,креатинфосфокиназната активност, efflux транспорта на калциевите йони през сарколемната мембрана на мускул E.D.L. и акумулирана в него активност(^{45}Ca).

При растящи плъхчета(фиг 1а) се установява след 48-часово гладуване чувствително спадане на АТФ-азната активност в сравнение с контролната група.Паралелно с това бе доказано намаляване и на креатинфосфокиназната активност,която от 23,03 E/mg белтък достига при гладувалите животни 15,90 E/mg белтък.Данните за скоростта на efflux транспорта на калциевите йони през сарколемната мембрана не показват съществени различия при гладувалите и нормално хранени плъхчета,докато акумулираната в мускула радиоактивност остава в много по-високи нива при контролните животни($P<0,001$)

На фиг. 2а, б и в са посочени данните от аналогичен опит,но при полово зрели плъхове със завършен растеж.При тези експериментални животни АТФ-азната активност след гладуване е повлияна в много по-малка степен в сравнение с растящите плъхчета. В подобен аспект се движи и креатинфосфокиназната активност,която в твърде малък процент спада при гладуващите животни.От представените фигури се вижда,че различията са твърде големи в промяната на АТФ-азната и креатинфосфокиназна активности вследствие гладуване при растящи и завършили растежа си животни.Това би могло да се обясни с по-голямата чувствителност на растящите животни към недоимъка на пластичен материал за протеиногенезата, а от там и за синтез на ензимни молекули.Фиг.2 б отразява резултатите за efflux -транспорта на калциевите йони. При 80-тата минута от степенното промиване на мускулите в нерадиоактивен Кребс-Рингеров бикарбонатен буфер опитните животни показват по-висока скорост на освобождаване на ^{45}Ca.В останалите промивни фракции,независимо,че разликите са недостоверни, се наблюдава тенденция на по-бързо-степенно освобождаване на калциевите йони от мускулите на контролните животни. Ретенцията на ^{45}Ca е в много по-големи стойности при контролните животни($P<0,001$)

Данните за влиянието на холестерола върху активността на АТФ-азата и креатинфосфокиназата,както и за efflux транспорта и акумулирането на ^{45}Ca са представени на фиг.3 а, б и в.При групата животни получили холестерол per os 16 часа преди декапитирането е поощрена активността на АТФ-азата с 26%.Това би могло да се дължи на променения флуидитет на мембраните в резултат на холестеролово натоварване на животните и повлияване на АТФ-азната активност и съответно йонтранспортната система на мускула(7,16,19).Креатинфосфокиназната активност при тези експериментални животни показва съответно по-ниски стойности.При този експеримент не можа да се установи кореспондентност в промените между АТФ-азната и креатинфосфокиназната активности.

Фиг. 3 б и в отразяват скоростта на efflux транспорта на калциевите йони и акумулирането на ^{45}Ca в мускул *E.D.L.*.Транспортът при контролните и опитните животни е еднаква скорост.Наблюдаваното несъкодостоверно по-ниско акумулиране на ^{45}Ca при опитните животни би могло да се дължи на увеличеното съдържание на холестерола в сарколемните мембрани и изменение на физикохимичните свойства на мембраните,при което се променя способността им да акумулират калциеви йони.Увеличаването и намаляването на АТФ-азната активност може да се обясни с промяна в уровена на белтъчния синтез и липидите в структурната организация на мембраните като цяло.

Фиг. 4 а, б и в отразяват стойностите на АТФ-азната и креатинфосфокиназна активности, а също транспорта на Са- йони в динамика и акумулирането на ^{45}Ca в мускул *E.D.L.* на плъхове подложени на холестеролово натоварване(6 дни в храната бе включен 5% холестерол.Вижда се,че при този експеримент не бе повлияна активността на АТФ-азата и креатинфосфокиназата на мускула.Същевременно се наблюдава една паралелност в

efflux транспорта и при двете групи животни на 100,110,130 и 150-тата минута от слединкубационното промиване на мускула в нерадиоактивен буфер.Под влияние на холестерола задържането на калциеви йони е силно намалено($P<0,001$).От този експеримент би могло да се направи заключение,че подвлияние на халестерола се променя проницаемостта на мембраните за Са-йони,вероятно вследствие деформация на каналите за Са-йони в съответната субединица на АТФ-азата(4,5,23).

Въпреки,че Са-йони излизат с еднаква скорост през сарколемната мембрана,тяхното количество при всички опитни животни вътре в мускула остава много по-ниско,поради отрицателното модулиране на Са-йонното влизане в мускула под влияние на гладуването и холестерола.Наред с това холестеролово натоварване на животните води до промяна и на съотношението фосфолипиди/холестерол в мембраните(т.е.насищане на мембраните с холестеролови структури(3,13,18).

ИЗВОДИ

В резултат на проведените експерименти за проучване влиянието на гладуването и холестеролово натоварване върху АТФ-азната и креатинфосфокиназна активност и транспорта на Са-йони през сарколемната мембрана на мускул *E.D.L.* би могло да се направят следните изводи:

При растящите животни гладуването води до високодостоверно подтискане на АТФ-азната активност,креатинфосфокиназната активност,а при полово зрелите животни промените са недостоверни.

Гладуването като екзогенен фактор не се отразява съществено върху efflux транспорта на Са-йони,докато ретенцията на ^{45}Ca и при двете възрастови групи е високодостоверно инхибирана.

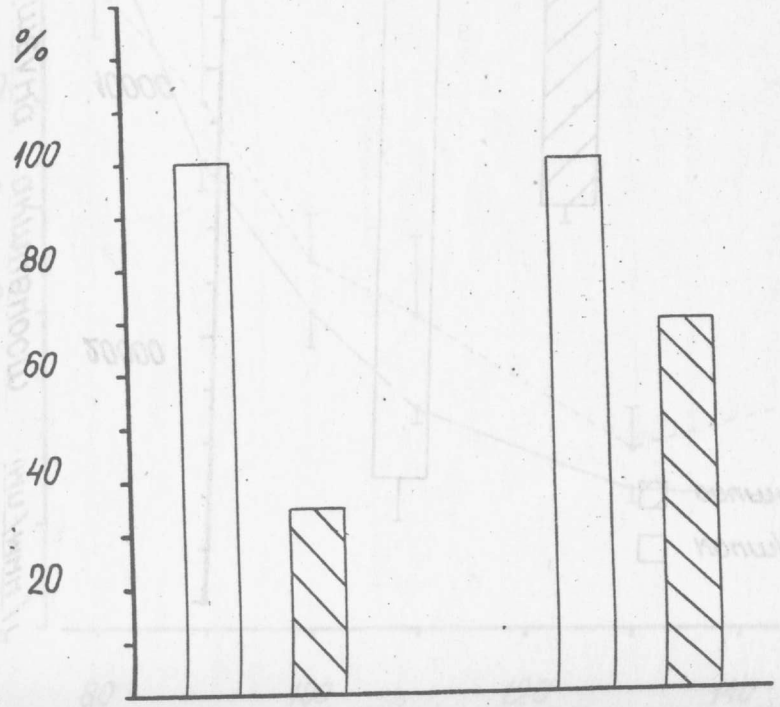
Прихолестеролово натоварване (16 часа) не бе установена достоверна промяна на АТФ-азната активност, а само е инхибирана креатинфосфокиназната активност.При продължителното холестеролово натоварване(6 дни) не се доказаха достоверни различия в АТФ-азната и Креатинфосфокиназната активност.

Под влияние на холестерола чувствително се засяга($P<0,001$) акумулирането на Са-йони в мускула(*E.D.L.*), а efflux транспорта не е повлиян съществено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веренинов А.А., Транспорт йонов через клеточную мембрану, Ленинград, 1978
2. Гринио Л.П., А.В.Консисторум, Вопр.медицинской химии, 10, вып. 1, 1964
3. Замараева М.В., А.И.Гагельганс, Б.А.Ташмухамедов, в кн. Транспорт йонов через биологические мембран и механизм действия физиологически активных веществ, Изд.ААН, Узбекской ССР, 1982
4. Курский М.Д., Гиммельрейх Н.Т., в кн. Молекулярная биология, Киев, 1976
5. Курский М.Д., Украинский биохимичен журнал, 53,2,1981
6. Плохинский Н.А, Биометрия, Новосибирск, 1961
7. Beynen A.C., A.Boogaard, H.LJJ.M.Van Laack and M.B.Katan, J.Nutrition, II4, I640, I984
8. CHiner A., T.Clausen and Girardier L., J.Physiol., 265, 43, I977
9. Clausen T., T.L.Andersen, M.Sturup-Johansen a;O.Petkova, BBA, 646, 26I, I98I
10. De Boland A.R., R.Jilka, A.Martonosi, J.Biol.Chem., 250,750I, I975
11. Fiske G.H. a.Subbarow Y., J.Biol.Chem.? 66, 375,60,I925
12. Kohn,P.G. a. T.Clausen, BBA, 225,277,I97I
13. Limas C.J.,Amer.J.Physiol.,235, H745, I978
14. Lowry,O.H.,Rosebroough N.J.,Farr A.L., a. Randall R.J., J.Biol.Chem., I93,265, I95I
15. Martonosi A.,R.Jilka, F.Tortier, in: Membrane proteins transport a.phosphoryl., Amsterdam
16. Mon-Liang-Chen, Duo-Fen-Chia a. Jin-Quan-Run, J.Nutr.,II4, 503, I984
17. Müller H.G. et al;, Das Deutsche Gesundheitswesen, I7 H26, I962
18. Nicholls D.G.; M.Crompton, FEBS LETT., III, 26I,I980
19. Ramirez H., M.J.Aejandre, M.F.Zafra, J.L.Setoria a.E.Garcia-Peregrin, Int.J. of Biochem.,I6,2,29I,I984
20. Recknagel R.O. a. Lombardi, J.Biol. Chem. 236, 564, I96I
21. Sigh T., J.Wang, J.Biol.Chem., 254, 8466, I979
22. Vanderkooi J.M. et al.? Biochemistry, I6, I262, I977
23. Wareen G.B. et al., J.Biochemistry, I3, 550I, I974

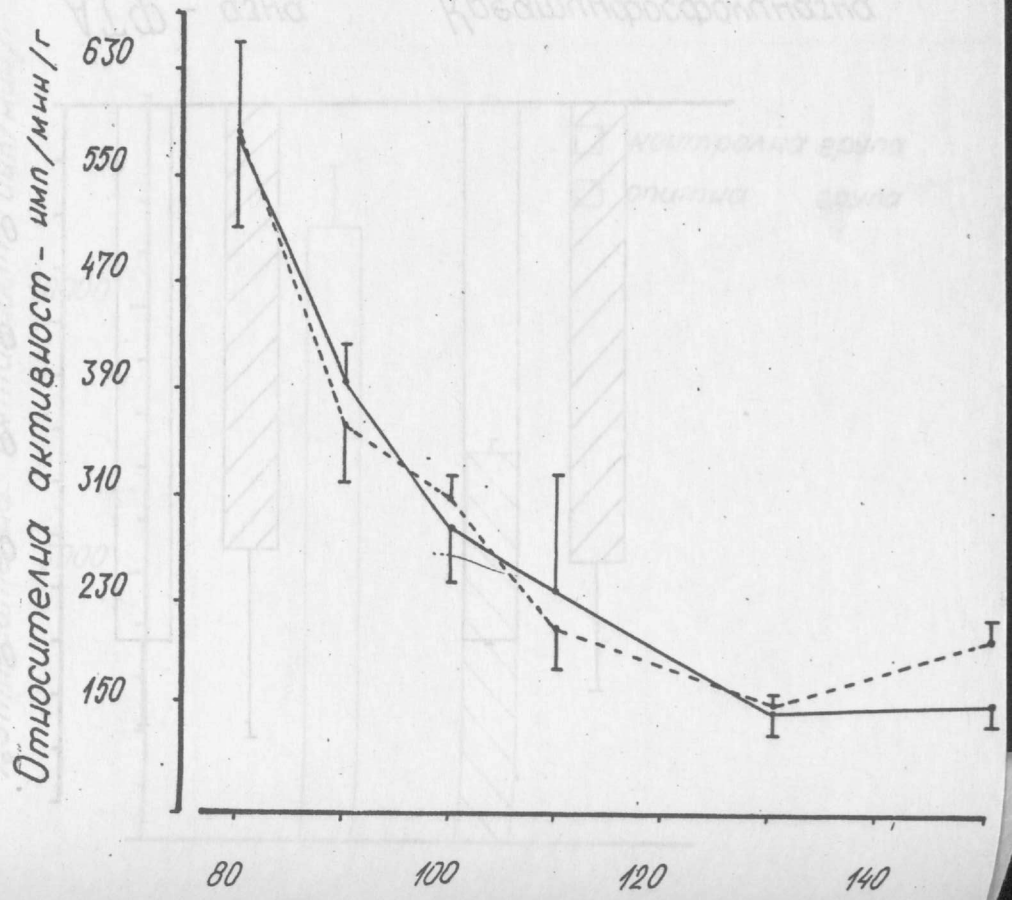
фие. 1а



АТФ - на активност
мкг Pн / g белт. / 5 min

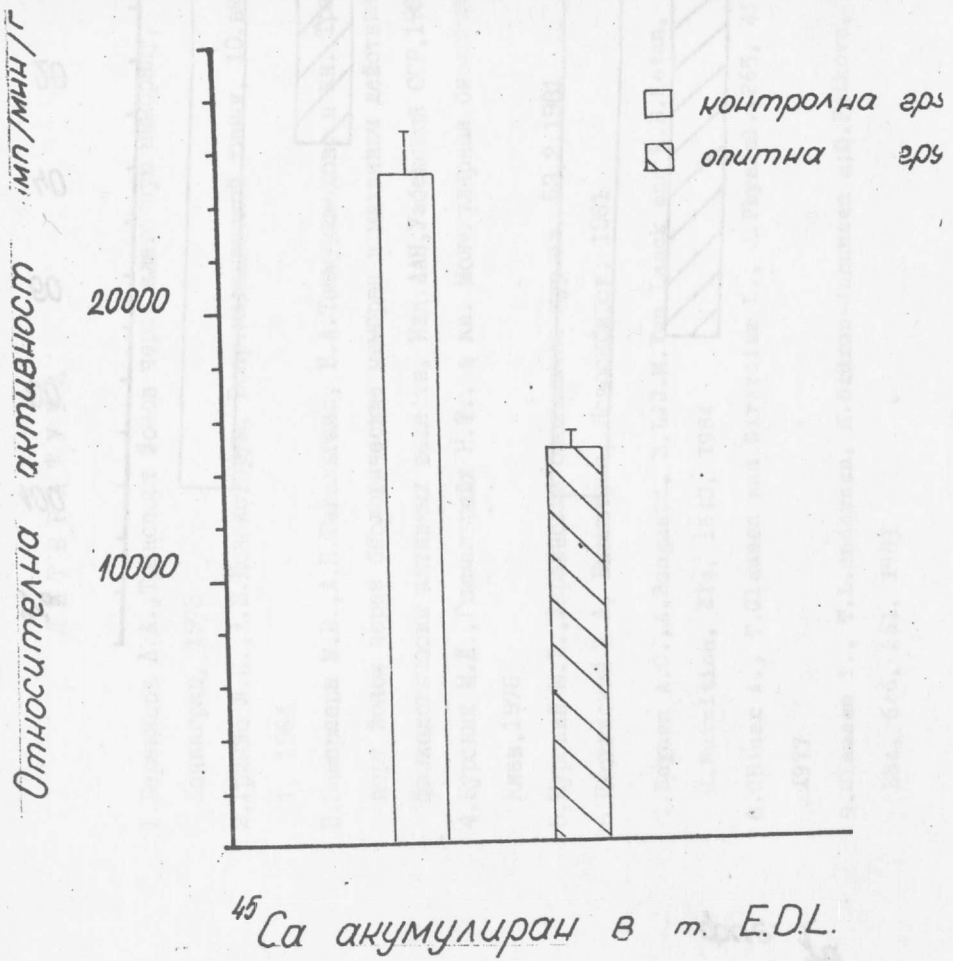
Креатинфосфокиназна активност
E / mg белт. / min

фиг. 1б



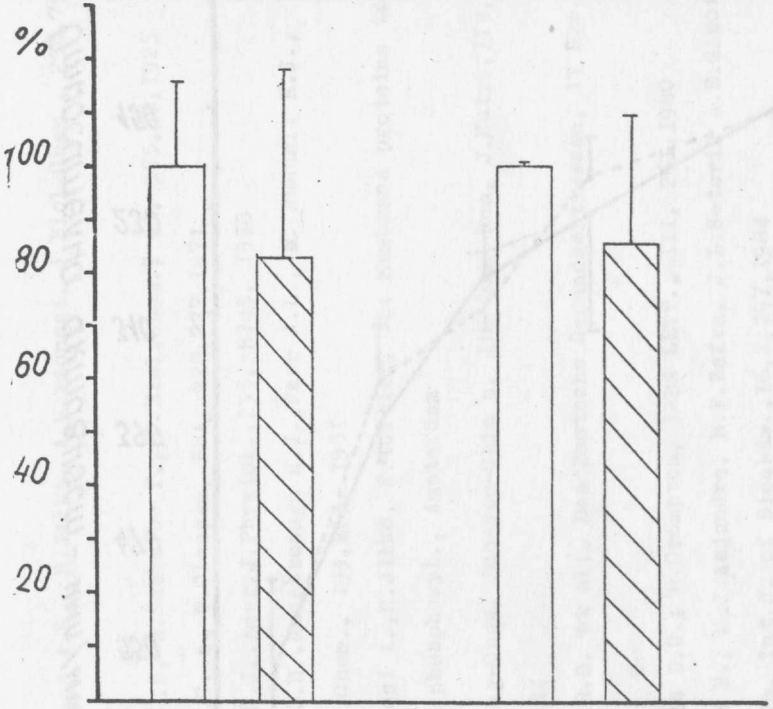
Efflux transport на ^{45}Ca през сарколемната мембрана на m. E.D.L.

фиг. 1в



^{45}Ca акумулиран в m. E.D.L.

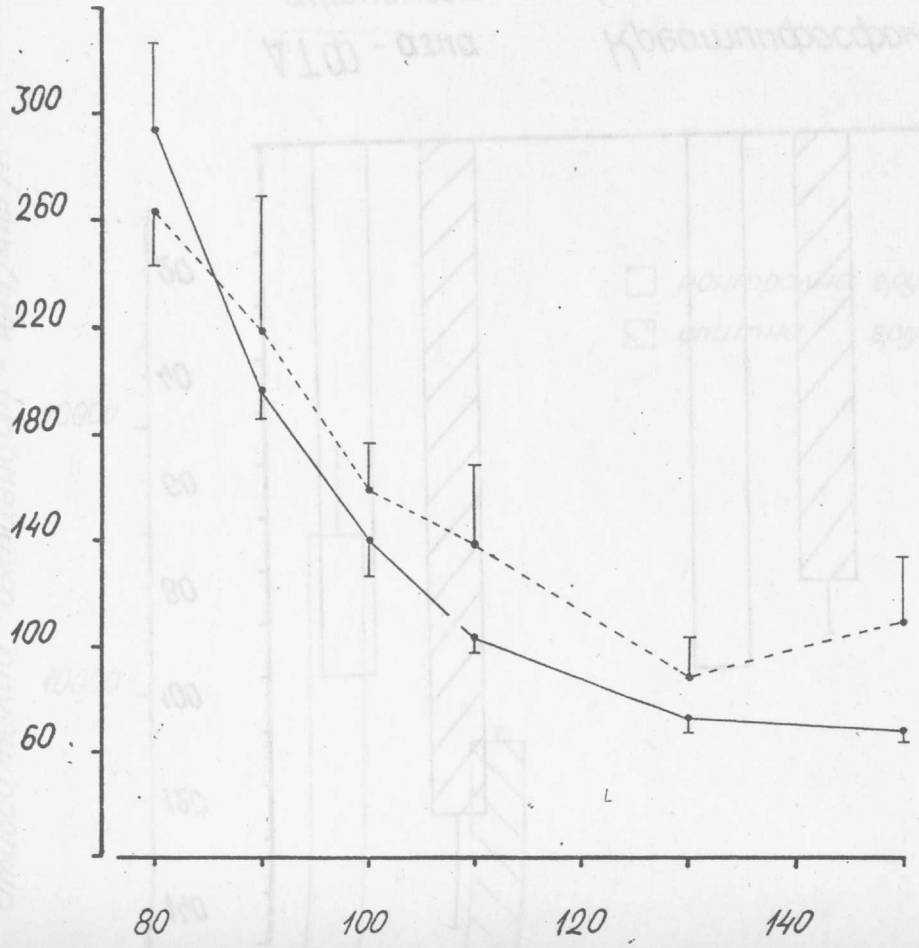
фиг. 2а



АТФ - азна активност
нкг $P_н$ / g белт. / 5 min

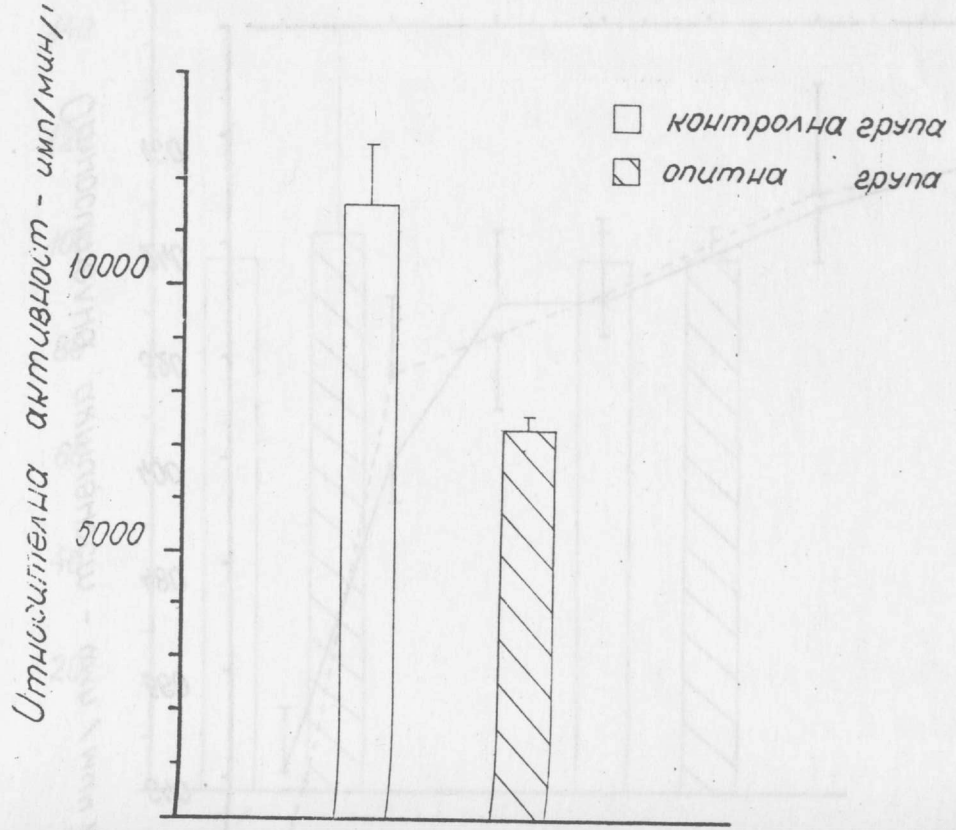
Креатинфосфокиназна активност
E / mg белт / min

фиг. 2б



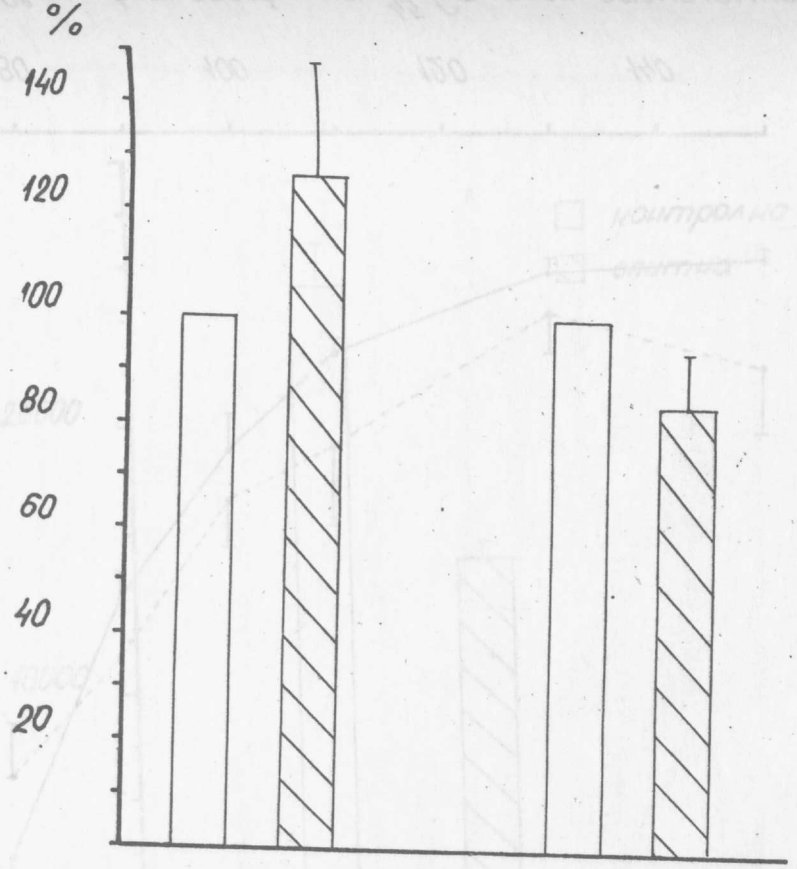
Efflux transport на ^{45}Ca през сарколемната мембрана на т. E.Dl.

фиг. 2в



^{45}Ca акумулиран в т. E.Dl.

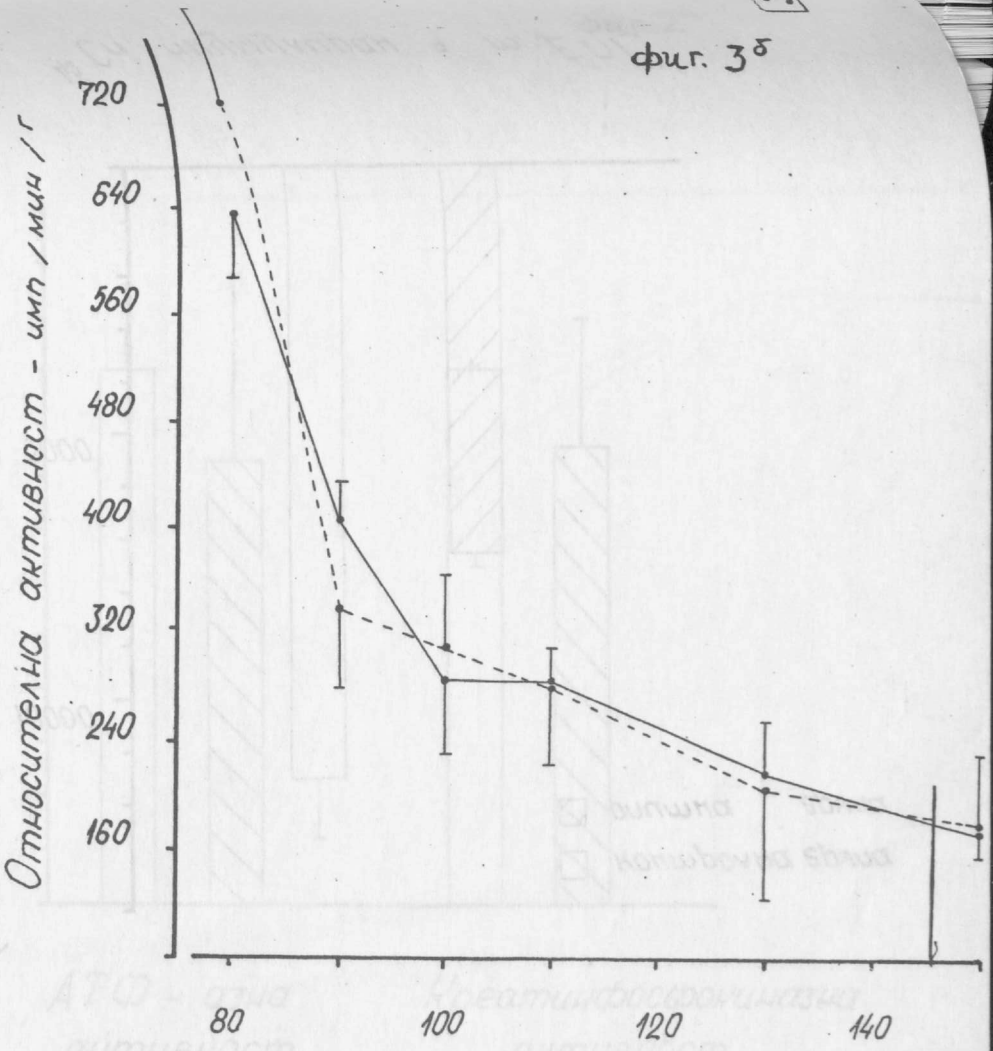
фиг. 3а



АТФ - азна активност
мкг Pи / g белт. / 5 min

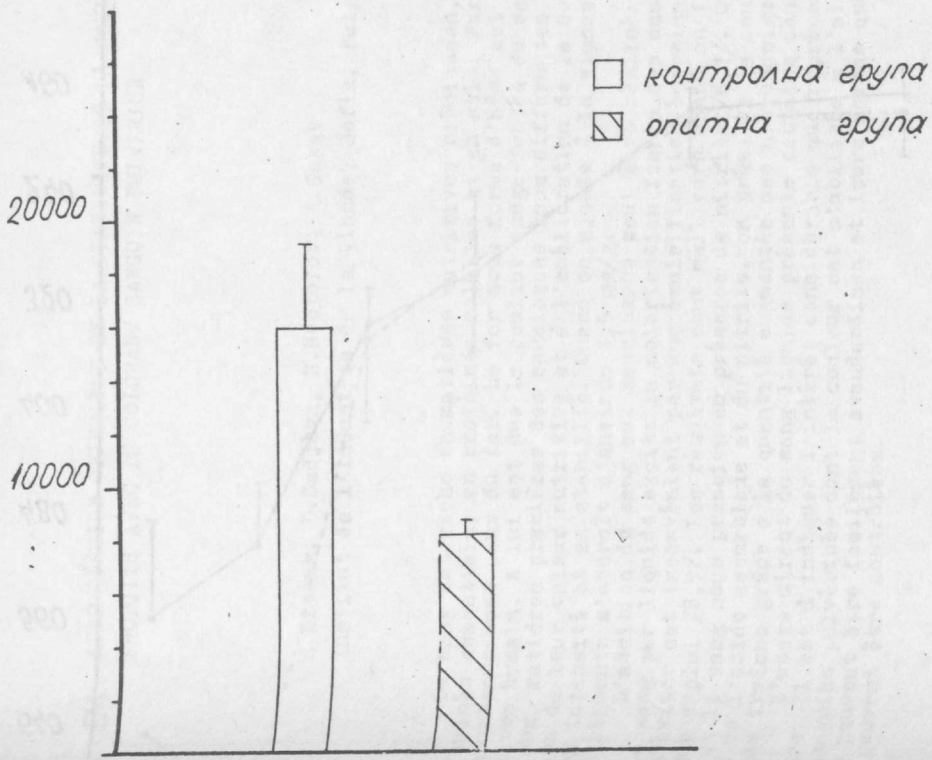
Креатинфосфокиназна активност
E / mg белт. / min

фиг. 3б



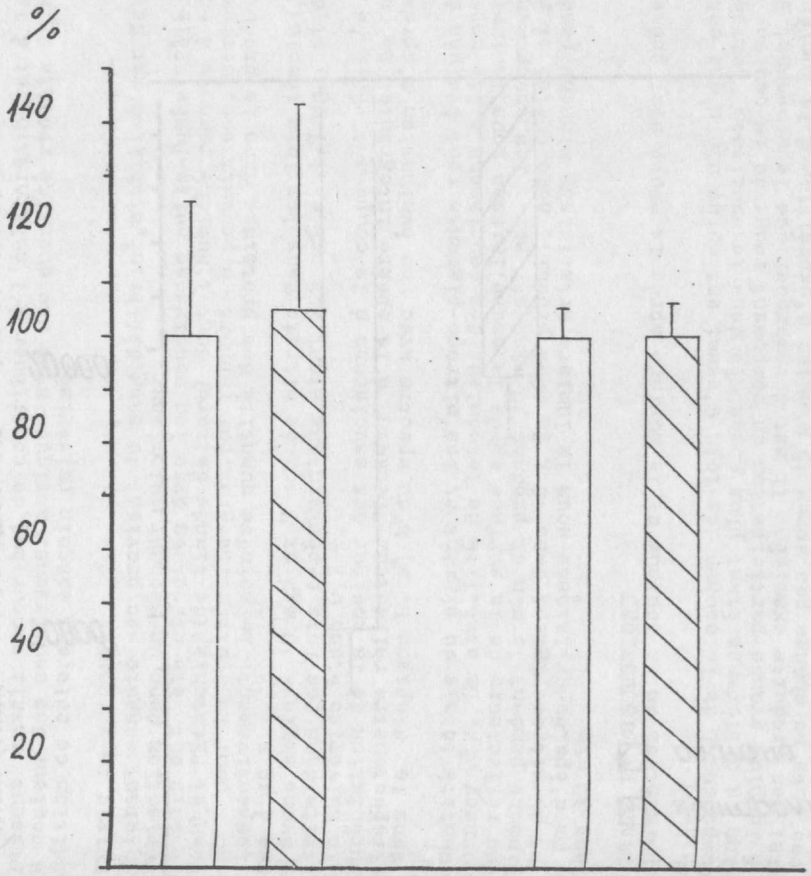
Efflux transport на ^{45}Ca през саркилемна мембрана на m. E.D.L.

фие. 3в



^{45}Ca акумулиран в т. E.D.L

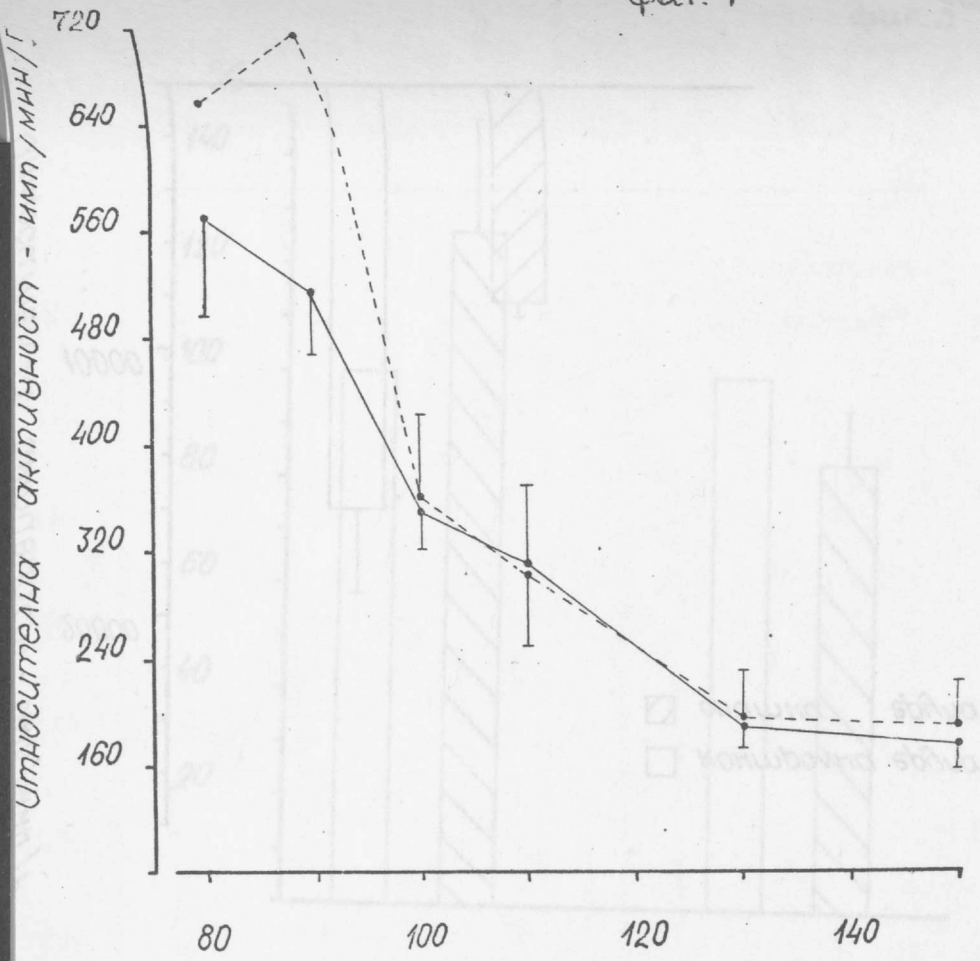
фиг. 4а



АТФ - на активност
мкг P_{H} / g белт. / 5 min

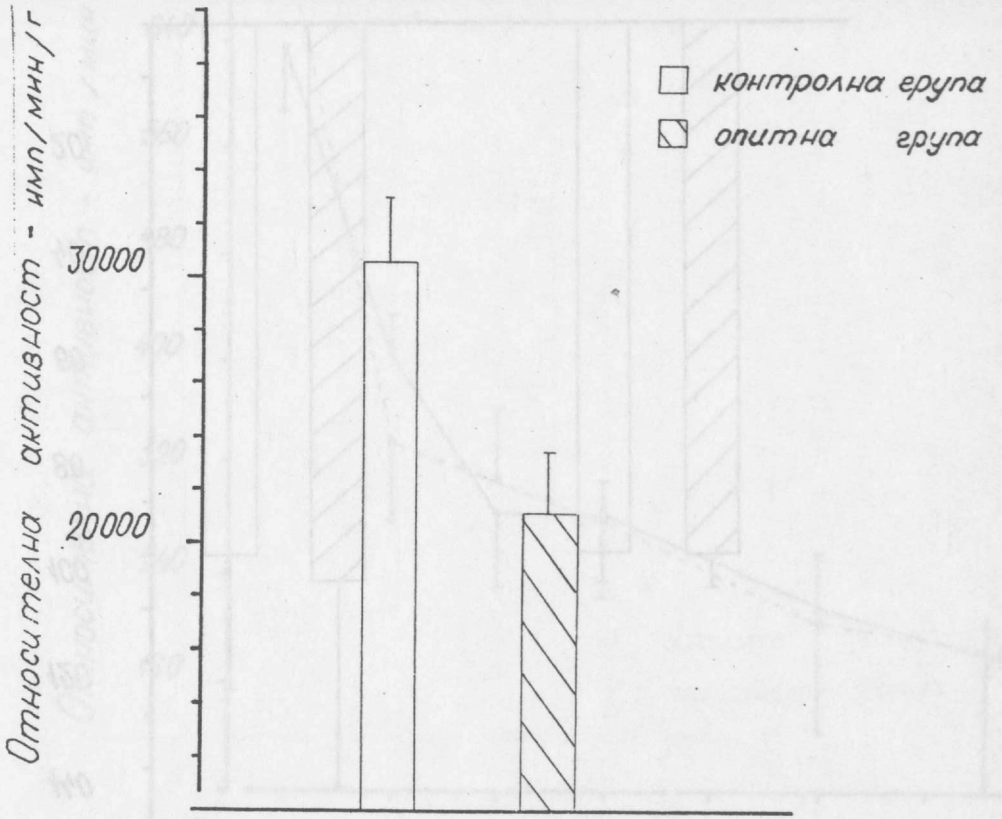
Креатинфосфокиназна активност
E/mg белт./min

фиг. 4б



Efflux transport на ^{45}Ca през сарколемната мембрана на m. E.D.L

фиг. 4в



^{45}Ca акумулиран в m. E.D.L.