

УДК 577.3

©Коллектив авторов

ОКСИД АЗОТА И ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ МЕТАЛЛЫ (Ca, Na, K) В КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМИСА

В.И. Петухов^{1}, Л.Х. Баумане², Е.В. Дмитриев³, А.Ф. Ванин⁴*

¹Балтийский институт психологии,
Рига, Латвия; LV-1003; тел.: (+371)67100608; факс: (+371)67100219;
эл. почта: vip-val@yandex.ru

²Латвийский институт органического синтеза, Рига, Латвия;

³Институт вычислительной математики РАН, Москва, Россия;

⁴Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия

С помощью атомно-эмиссионной спектроскопии и ЭПР-анализа исследован металло-лигандный гомеостаз (МЛГ) в клетках эпидермиса у 954 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС и 947 практически здоровых лиц. Особый интерес вызывает возможная связь редокс-статуса с количественными сдвигами в МЛГ, которые можно использовать в качестве дискриминаторов окислительного/нитрозативного стресса. Отличительные признаки последнего, которые касались, главным образом, электрогенных металлов (Ca, K, Na), были обнаружены не только среди ликвидаторов аварии, но и у некоторых практически здоровых лиц (18,1%), что может свидетельствовать о наличии у них окислительного/нитрозативного стресса не лучевой природы. Выявленная связь внутриклеточной продукции оксида азота (NO) с количественными сдвигами электрогенных металлов может указывать на возможное участие NO в генерации электрического потенциала клетки.

Ключевые слова: оксид азота, металло-лигандный гомеостаз, редокс-статус, эпидермис.

DOI: 10.18097/PBMC20156104503

ВВЕДЕНИЕ

Электрические потенциалы (ЭП), присущие всем жизнеспособным клеткам, принимают непосредственное участие в гомеостазе, как на уровне клетки, так и всего организма. Наиболее наглядно, а потому и наиболее изучено, это участие в нервной ткани, ЭП которой делят на два основных класса: локальные (градуальные) и потенциалы действия. Последние вызываются локальными ЭП и, обладая фиксированной длительностью и амплитудой, способны распространяться по нервным волокнам на большие расстояния. Важной особенностью ЭП является их идентичность или, другими словами, независимость от специализации нервной ткани и характера проводимого сигнала не только в разных категориях нервных клеток, но и среди разных представителей животного мира.

Генерацию ЭП, как известно, вызывает движение ионов через клеточную мембрану по так называемым ионным каналам (водным порам трансмембранных белков), способным активироваться (открываться) и деактивироваться, когда вероятность их открытия

резко снижена вплоть до полной блокады. По способу активирования ионные каналы можно разделить на механочувствительные, потенциал-активируемые и лиганд-активируемые. Участвующие в трансмембранном трафике ионы (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , H^+) имеют непосредственное отношение к генерации ЭП.

Пассивное движение ионов по каналам происходит в соответствии с градиентом концентрации и электрическим градиентом мембраны. При этом противоположно направленный электрический градиент, снижающий до нуля конечный ток того или иного иона, является равновесным потенциалом данного иона.

Для генерации ЭП и поддержания на постоянном уровне внутриклеточной концентрации ионов клетка запускает активные транспортные механизмы противодействия электрохимическому градиенту (первичный и вторичный активный транспорт), что позволяет сохранять неизменным потенциал покоя.

Первичный транспорт использует энергию гидролиза АТФ, например, Na/K-помпа (Na/K-АТРаза), которая за счёт энергии расщепления одной

* - адресат для переписки

молекулы АТР переносит три иона Na наружу и два иона K внутрь клетки, меняя тем самым суммарный трансмембранный заряд на единицу при каждом таком переносе. К первичным системам активного транспорта ионов относятся Са-АТРазы плазматической мембраны, выводящие Са из клетки, и семейство Са-АТРаз эндо- и саркоплазматического ретикулумов (SERCA), закачивающие Са во внутриклеточные структуры.

Вторичный активный транспорт ионов осуществляется за счёт энергии передвижения Na^+ в направлении его электрохимического градиента и зависит от эффективной работы Na/K-насоса, обеспечивающего существование этого градиента. Примером вторичного транспорта является Na/Ca-обменник, который выводит один ион кальция (Ca^{2+}) за счёт входа в клетку трёх ионов натрия (Na^+). Na/K-насос, Са-АТРазы и H^+ /K-АТРазы образуют суперсемейство АТРаз Р-типа (P-type), которое интенсивно изучается в последние годы [1-3].

Трансмембранный трафик электрогенных металлов (Ca, Na, K) с участием соответствующих АТРаз (Ca^{2+} -АТРазы и Na^+ /K⁺-АТРазы) отличается по своему механизму от трафика тяжёлых металлов (например, меди с помощью Cu^+ -АТРазы). Если первым (Ca, Na, K) для продвижения по каналу (после взаимодействия с металлсвязывающими участками АТР-помп, так называемыми трансмембранными сайтами – TM-MBS) достаточно присутствовать в цитоплазме в виде гидратированных ионов (Ca^{2+} , Na^+ , K^+), то перенос тяжёлых металлов возможен лишь в форме металло-лигандных комплексов, где в роли лигандов выступают белки-шапероны, без которых не происходит связывание металлов с TM-MBS. Наиболее известные шапероны для внутриклеточного транспорта меди – Atox1, CCS, Cox17.

Важная роль в регуляции трансмембранного транспорта Ca^{2+} в кардиомиоцитах принадлежит редокс-процессам с участием активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА). Белок, транспортирующий Ca^{2+} через мембрану саркоплазматического ретикулума (СР) с молекулярной массой 565 кДа, имеет тетрамерную структуру и ~90 цистеиновых остатков в каждом из мономеров [4-6]. По мнению исследователей, именно состояние тиоловых групп цистеина на цитозольной стороне мембраны СР, легко подвергающихся редокс-модификации (окисление с образованием дисульфидных связей, S-нитрозилирование, S-глутатионилирование), определяют проводимость каналов АТРаз в кардиомиоците [7]. В роли окислителей (редокс-модификаторов) выступают постоянно продуцируемые в клетке пероксинитрит (NOOO^-), образующийся из NO, и супероксид анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Увеличение продукции $\text{O}_2^{\bullet-}$ и NO (окислительный/нитрозативный стресс) может, по-видимому, приводить к ещё большей активации АТРаз Р-типа (возможно, за счёт вовлечения в процесс трансмембранного переноса большего числа белковых молекул и/или участия

в качестве редокс-модификаторов более агрессивных АФА: ONOO^- , NO_2^*). Поэтому в условиях окислительного/нитрозативного стресса можно ожидать количественные сдвиги внутриклеточных концентраций не только электрогенных (K, Na, Ca), но и других, в частности, тяжёлых металлов (Cd, Zn, Pb, Cu, Co, Ag), трафик которых через наружную мембрану осуществляет P_{1B} -type-помпа из суперсемейства АТРаз (P-type) [2].

На реальность таких событий могут указывать данные спектроскопии клеток эпидермиса (точнее, его деривата – волос), полученные нами у ликвидаторов Чернобыльской аварии [8]. Выбор последних в качестве субъектов исследования был не случайным. Дело в том, что основным отличительным признаком биохимических процессов в организме “чернобыльцев” является повышенная, по сравнению с нормой, активность кислородных и азотных радикалов или хронический окислительный/нитрозативный стресс, имеющий (как показывают наши наблюдения) непосредственное отношение к событиям металло-лигандного гомеостаза. Результаты исследования редокс-статуса у ликвидаторов Чернобыльской аварии свидетельствовали о заметном прооксидантном сдвиге, который не удавалось полностью ликвидировать даже после длительного приёма антиоксидантов [9].

МЕТОДИКА

Используя метод количественной ЭПР-спектроскопии с применением *in vitro* комплекса Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) в качестве спиновой “ловушки” NO, образующей с ним парамагнитные мононитрозильные комплексы железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК), нам удалось оценить уровень NO и комплексов Fe^{3+} (сигнал ЭПР $g=4,3$) в таком биосубстрате, как дериват эпидермиса (волосы) [10].

В Центре биотической медицины (г. Москва) методом атомно-эмиссионной спектроскопии на приборе Optima 2000 DV был проведён анализ минерального состава волос у 947 здоровых лиц (238 мужчин и 709 женщин в возрасте от 2 до 86 лет), а также у 954 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС – жителей Москвы (213 женщин и 741 мужчина в возрасте от 37 до 82 лет) [8]. Забор материала (при обязательном информированном согласии испытуемых) и спектроскопические исследования проводили с 1998 г. по 2001 г. (через 12-15 лет после Чернобыльской аварии). При этом различие временных интервалов (от участия в аварийных работах до спектроскопического анализа) не превышало трёх лет.

Проверку гипотезы о нормальном распределении мы проводили с помощью теста Jarque-Bera [11] и теста Kolmogorov-Smirnov [12]. В результате этой проверки удалось с большой вероятностью опровергнуть гипотезу о нормальном распределении химических элементов [13]. Поэтому применялись альтернативные подходы (*bootstrap methods*), не требующие нормального распределения

априорного ансамбля [14]. При выявлении возможных половых различий в минеральном составе волос обнаружено, что содержание кальция (Ca) и ванадия (V) зависело от пола. Поэтому концентрационные значения этих металлов регистрировали отдельно для мужчин и женщин.

В генеральных совокупностях данных спектрометрии у чернобыльцев ($n=954$) и здоровых лиц ($n=947$) определяли тесноту линейной связи (Pearson) между концентрационными значениями калия (K) и цинка (Zn). Чтобы выяснить, насколько однородны исследуемые группы по значению r_{K-Zn} , использовали предложенную нами ранее методику селективного отбора лиц с максимальным и близким к нулю значениями коэффициента r из общей совокупности [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни NO и комплексов Fe^{3+} (сигнал ЭПР $g=4,3$) в деривате эпидермиса, оцененные методом ЭПР, у ликвидаторов аварии ($n=45$) достоверно ($p<0,05$) превышали нормальные значения ($25,9\pm 1,8$ vs $20,7\pm 2,5$ и $0,11\pm 0,01$ vs $0,07\pm 0,004$ resp.). Результаты исследования представлены в таблице 1.

Более высокий, по сравнению с нормой, уровень не только NO, определяемый по количеству MNКЖ-ДЭТК, но и комплексов Fe^{3+} ($g=4,3$) у чернобыльцев даёт основание рассматривать оба эти показателя в качестве дискриминаторов нитрозативного стресса.

Кроме того, у чернобыльцев был выявлен ещё один критерий отличия. Это теснота линейной связи между содержанием калия (K) и цинка (Zn) по коэффициенту корреляции r (Pearson). У чернобыльцев r_{K-Zn} ($-0,42$; $p<0,05$) оказался в полтора раза выше, чем у здоровых ($r_{K-Zn}=-0,28$; $p<0,05$).

Было интересно узнать, насколько однородны исследуемые группы по значению r_{K-Zn} . С этой целью использовали предложенную нами ранее методику селективного отбора из общей совокупности лиц с максимальным и близким к нулю значениями коэффициента r [15].

У абсолютного большинства ликвидаторов аварии (88%) K-Zn корреляция была негативной и значимой (у 205 чел. $r_{K-Zn}=-0,62$; $p<0,05$; у 634 чел. $r_{K-Zn}=-0,41$; $p<0,05$). У 12% чернобыльцев (115 чел.) она не выявлялась ($r=-0,03$). K-Zn связь отсутствовала ($r = -0,01$) у 253 здоровых лиц (26,7%), у 523 чел. (55,2%) была слабо выраженной ($r_{K-Zn}=-0,22$; $p<0,05$)

и отчётливо выявлялась ($r_{K-Zn}=-0,43$; $p<0,05$) лишь у 171 чел. (18,1%).

Показательно, что выраженная позитивная корреляция между K и Na, которая для всей группы здоровых ($n=947$) составляла ($r_{K-Na}=0,64$), практически не менялась (0,64; 0,71; 0,53; resp.) при разных r_{K-Zn} . Это, по-видимому, может объясняться стабильной (без сбоев) работой мембранного K/Na-насоса у здоровых лиц. Столь же тесной ($r=0,64-0,75$) K-Na связь была у абсолютного большинства ликвидаторов аварии (в общей группе $r_{K-Na}=0,71$), но заметно слабее в подгруппе с $r_{K-Zn}=-0,03$ ($r_{K-Na}=0,31$).

Концентрационные значения металлов в эпидермисе ликвидаторов аварии имели достоверные различия с контрольной группой. Результаты спектрометрии эпидермальных клеток, полученные в обеих генеральных совокупностях и в группе здоровых, в зависимости от величины $|r|_{K-Zn}$, представлены в таблице 2.

Анализ металло-лигандного гомеостаза (МЛГ) в эпидермальных клетках у здоровых лиц при крайних значениях r_{K-Zn} ($-0,01$ и $-0,43$) показал, что сдвиги в МЛГ у здоровых с $r_{K-Zn}=-0,43$, по сравнению с $r_{K-Zn}=-0,01$, по своей направленности (а в ряде случаев и по величине) аналогичны таковым в общей группе ликвидаторов аварии ($n=954$), если сравнивать их с общей контрольной группой ($n=947$) (см. табл. 2). Вывод, который кажется очевидным, но, тем не менее, требует проверки, это – наличие окислительного/нитрозативного стресса (не лучевой природы) у здоровых лиц с $r_{K-Zn}=-0,43$.

Было интересно узнать, как влияет величина $|r|_{K-Zn}$ на концентрационные значения металлов у чернобыльцев. Для этого были найдены значения средней (M) с интервальной оценкой для каждого металла в зависимости от r_{K-Zn} (см. табл. 3).

Как следует из таблицы 3, ожидаемые изменения концентрационных значений металлов в зависимости от величины $|r|_{K-Zn}$ у ликвидаторов аварии (подобные тем, что были обнаружены у здоровых лиц, табл. 2) ограничивались лишь цинком и электрогенными металлами (K, Na, Ca). У всех остальных металлов достигнутый максимум (например, у Fe, Cd, Al, Cr, Pb) или минимум (у Cu) их содержания в клетке практически не менялся при разных значениях $|r|_{K-Zn}$. Причина такого “несовпадения”, по крайней мере, для Cd, Zn и Cu может объясняться следующим.

Главная роль в связывании (детоксикации) металлов (как внутри, так и вне клетки) принадлежит металлотионеинам (MT) – низкомолекулярным белкам

Таблица 1. Интенсивность сигналов ЭПР MNКЖ-ДЭТК и комплексов (NO) и комплексов Fe^{3+} в деривате эпидермиса (волосы).

	Величина ЭПР-сигнала в условных единицах (u)	
	Ликвидаторы аварии ($n=45$)	Контрольная группа ($n=40$)
Уровень NO	25,9±1,8*	20,7±2,5
Уровень Fe^{3+}	0,11±0,01*	0,07±0,004

Примечание: результаты представлены в виде средней ± ошибка средней. * - достоверность различия с контролем по t-критерию ($p<0,05$).

ОКСИД АЗОТА И ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ МЕТАЛЛЫ (Ca, Na, K) В КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМИСА

Таблица 2. Содержание металлов в эпидермальных клетках у здоровых лиц и ликвидаторов Чернобыльской аварии.

Металлы	Здоровые (n=947), мкг/г	Ликвидаторы аварии (n=954), мкг/г	Здоровые (n = 947), мкг/г	
			I группа	II группа
			$r_{K-Zn} = -0,01$ (n=253)	$r_{K-Zn} = -0,43$ (n=171)
K	277,4< 317,7 <361,1	365,8< 394,8 <422,4*	82,6< 127 <181,9	715,3< 894 <1094,8*
Na	427,9< 480,9 <542,9	757,5< 822,3 <892,4*	159,7< 197,8 <245,4	1020,6< 1233,9 <1506,5*
Ca _(жен)	1348,1< 1439,6 <1528,4	832,0< 927,4 <1032,8*	1494,6< 1627,8 <1770,8	788,8< 946,8 <1101,1*
Ca _(муж)	529,1< 620,1 <763,1	560,0< 577,6 <601,5	755,0< 934,7 <1152,5	621,4< 856,9 <1111,6
V _(жен)	0,058< 0,06 <0,07	0,10< 0,12 <0,13*	0,05< 0,06 <0,07	0,08< 0,09 <0,11*
V _(муж)	0,08< 0,09 <0,1	0,11< 0,116 <0,12*	0,05< 0,06 <0,07	0,09< 0,11 <0,13*
Zn	181,5< 185,2 <189,3	162,5< 165,8 <169*	196,0< 204,3 <213,5	143,2< 150,7 <158,3*
Cu	19,06< 20,7 <22,3	10,6< 10,99 <11,4*	18,6< 21 <23,5	14,3< 16 <18,2*
Cd	0,04< 0,05 <0,06	0,2< 0,25 <0,3*	0,027< 0,03 <0,04	0,05< 0,06 <0,08*
Fe	19,3< 21,07 <23,1	22,4< 23,7 <25,07**	15,0< 17,8 <21,5	20,0< 22,5 <24,9**
Al	8,1< 8,8 <9,5	19,3< 20,1 <20,9*	4,3< 5,2 <6,2	10,8< 12,3 <14,2*
Cr	0,48< 0,51 <0,54	0,85< 0,9 <0,92*	0,35< 0,39 <0,42	0,62< 0,72 <0,83*
Pb	1,04< 1,1 <1,27	1,5< 1,8 <2,2*	0,68< 0,95 <1,3	1,1< 1,4 <1,6**
Li	0,03< 0,04 <0,05	0,05< 0,06 <0,062*	0,02< 0,023 <0,03	0,046< 0,05 <0,06*

Примечание: жирным шрифтом обозначена величина средней, обычным - границы доверительных интервалов (bootstrap-метод); достоверность различия: * - $p < 0,001$; ** - $p < 0,05$.

Таблица 3. Содержание металлов в эпидермальных клетках в зависимости от r_{K-Zn} у ликвидаторов Чернобыльской аварии.

Металлы	$r_{K-Zn} = -0,03$ (n = 115), мкг/г	$r_{K-Zn} = -0,41$ (n = 634), мкг/г	$r_{K-Zn} = -0,62$ (n = 205), мкг/г
K	101,8< 150,5 <212,7	345,8< 380,4 <414,3	502,9< 578,1 <660,5*
Na	202,6< 261,8 <329,8	753,6< 825,2 <900,8	970,6< 1131,3 <1304,6*
Ca _(жен)	1066,1< 1247,9 <1483,7	–	653,6< 759 <865,9*
Ca _(муж)	629,1< 706,5 <793,9	544,7< 569,2 <597	508,1< 537,7 <571,7*
V _(жен)	0,09< 0,1 <0,13	–	0,11< 0,13 <0,14
V _(муж)	0,10< 0,13 <0,17	0,11< 0,12 <0,13	0,08< 0,1 <0,12
Zn	172,3< 183,5 <194,5	160,5< 164,6 <168,8	153,5< 159,3 <165,4*
Cu	9,9< 10,9 <12,1	10,6< 11 <11,5	10,3< 11 <11,9
Cd	0,16< 0,21 <0,26	0,23< 0,27 <0,32	0,19< 0,22 <0,26
Fe	18,6< 22 <26,3	22,3< 24,1 <25,9	21,9< 23,7 <26
Al	16,6< 20,2 <24,3	19,1< 20 <21	18,9< 20,2 <21,5
Cr	0,71< 0,81 <0,97	0,85< 0,9 <0,95	0,8< 0,86 <0,92
Pb	0,8< 1,5 <2,5	1,7< 2,1 <2,5	1,2< 1,3 <1,5
Li	0,04< 0,06 <0,08	0,05< 0,057 <0,06	0,05< 0,06 <0,07

Примечание: жирным шрифтом обозначена величина средней, обычным - границы доверительных интервалов (bootstrap-метод); * - достоверность различия между крайними группами ($p < 0,001$).

(6-7 кДа), в которых 20 из 60-68 аминокислотных остатков представлены цистеином. Выделяют 4 класса МТ. Два из них: МТ-1 и МТ-2 экспрессируются у млекопитающих почти во всех тканях. Они играют ключевую роль в гомеостазе Zn^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} и Hg^{2+} . Два других – МТ-3 и МТ-4 – имеют тканевую специфичность [16]. Ионы Zn^{2+} сравнительно легко оказываются в молекуле МТ, и так же легко могут быть вытеснены избытком Cd^{2+} и/или нитрооксидом.

Для связывания металлов в молекуле МТ существуют два домена (α и β), имеющие существенные различия [17]. Одно из таких

различий – неодинаковые концевые остатки аминокислот в кластерах для связывания металлов. В α -домене, предназначенном, главным образом, для “токсичных” металлов (в частности, для Cd), концевые остатки представлены карбоксилем (carboxyl-terminal domain), а в β -домене – аминогруппой (amino-terminal domain). Именно из β -домена, который преимущественно связывает эссенциальные металлы (Zn , Cu), молекулам NO (возможно, в результате трансформации в NO^+ и/или $ONOO^-$) удаётся избирательно высвободить Zn^{2+} и Cu^+ за счёт нитрозилирования тиолов и образования S-нитрозотиолов, оставляя практически незатронутым Cd -содержащий α -домен [18].

В то же время высвобождение Zn^{2+} в значительной мере зависит от редокс-статуса клетки, проокислительные сдвиги в которой (например, накопление окисленного глутатиона-GSSG) помогают выходу Zn^{2+} из молекулы МТ, тогда как восстановленный глутатион (GSH), в отсутствие GSSG, тормозит этот процесс [19, 20]. Таким образом, связь Zn с β -доменом МТ оказывается неустойчивой в условиях длительного (в течение нескольких лет, как у чернобыльцев) существования окислительного/нитрозативного стресса.

Особого внимания, на наш взгляд, заслуживают события в металло-лигандном гомеостазе электрогенных металлов (Ca, K, Na), уровень которых у ликвидаторов аварии зависел от величины $|r|_{K-Zn}$ и обнаруживал аналогичные изменения в крайних по значению $|r|_{K-Zn}$ подгруппах, что и у здоровых лиц (см. табл. 2 и 3).

Если теснота негативной K-Zn связи на фоне окислительного/нитрозативного стресса действительно отражает активность суперсемейства мембранных АТРАЗ (на что косвенно могут указывать результаты спектрометрии), то обнаруженная “чувствительность” электрогенных металлов к повышенной продукции АФК и АФА, которая, наряду с ростом $|r|_{K-Zn}$, сопровождается заметными сдвигами внутриклеточного уровня Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , должна с неизбежностью приводить и к изменению ЭП клетки.

Более того, есть основание предполагать, что эти изменения могут иметь колебательный характер, обусловленный циклической вариацией уровня NO и ионов нитрозония (NO^+) в клетках и тканях. Как было показано в [22], NO, ионы Fe^{2+} и низкомолекулярные тиолы способны образовывать самоподдерживающуюся, саморегулирующуюся химическую систему, в которой непрерывно возникают S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами. Их взаимопревращение обеспечивает колебательное изменение уровня этих соединений и сопутствующее этому процессу периодические колебания содержания NO, NO^+ , двухвалентного железа и тиолов, не входящих в S-нитрозотиолы (ДНКЖ), по типу реакции Белоусова-Жаботинского. Циклическое изменение уровня ионов нитрозония, способного S-нитрозировать тиолы [21], может синхронно (в колебательном режиме) изменять активность мембранных АТРАЗ, содержащих тиоловые группы, и тем самым вызывать осцилляцию уровня электрогенных металлов и связанные с этой осцилляцией изменения ЭП клеток и тканей.

Таким образом, значение NO^+ -продуцирующей системы оказывается существенным образом расширено. И, в первую очередь, это касается тех клеток, основная функция которых непосредственно связана с генерацией ЭП (нейроны, пейсмекеры синусного узла, кардиомиоциты, миоциты кровеносных сосудов и кишечника и др.).

Современное представление о природе сердечного автоматизма основано на вероятном существовании в клетках-пейсмекерах и кардиомиоцитах двух синхронно работающих осцилляторов ЭП:

в мембране СР (“кальциевые часы”) и наружной мембране (“мембранные часы”). При этом трансмембранные перемещения Ca^{2+} , вызывающие изменения ЭП, происходят при активном участии АТФ-зависимых кальциевых насосов, работающих, по мнению исследователей, в автоматическом режиме [23, 24]. Роль пейсмекера в этом процессе отводится “кальциевым часам”, взаимоотношения которых с “мембранными часами” строятся по принципу подчинения. Один из аргументов в пользу такого распределения ролей основан на том, что полное выключение “мембранных часов” не влияет на работу “кальциевых часов” [25], в то время как остановка последних означает и прекращение функционирования “мембранных часов”, которые удавалось вновь “запустить” дополнительным количеством Ca^{2+} [26].

Обнаруженные с помощью конфокальной микроскопии “кальциевые спарки” (локальное и периодическое повышение концентрации Ca^{2+} в разных участках миоплазмы кардиомиоцита) трактуются как наглядная иллюстрация работы “кальциевых часов”. А совпадающее с Ca^{2+} циклическое изменение уровня NO в миокарде во время его сокращений связывают с колебаниями уровня Ca^{2+} в миоплазме [27].

Несмотря на определённую логику таких рассуждений, трудно отделаться от сомнений в правильности выбора “водителя ритма” в системе осцилляторов: “NO-осциллятор” → “кальциевые часы” → “мембранные часы”, где “кальциевые часы” – в роли пейсмекера.

События в клетках эпидермиса на фоне окислительного/нитрозативного стресса, когда изменения содержания электрогенных металлов (в том числе и Ca) выглядят, скорее, следствием, нежели причиной проокислительных сдвигов, делают оправданным (в качестве “водителя ритма” среди указанных осцилляторов) выбор NO^+ , генерируемого в режиме автокатализа. К такому выводу склоняет и повсеместная распространённость (универсальность) автоколебательной системы $RS-NO \leftrightarrow ДНКЖ$, которую (в отличие от саркоплазматического ретикулума) можно обнаружить практически во всех клетках.

Почему так важно сделать правильный выбор “водителя ритма” при одновременном функционировании нескольких осцилляторов?

Дело в том, что циклическость присуща многим (если не всем) природным явлениям. Но в живых системах особое значение приобретает не столько само существование циклических процессов (которых уже довольно много обнаружено, в том числе, среди химических взаимодействий), сколько организация этих процессов во времени и пространстве, их способность к самонастройке и саморегулированию. От “правильной” работы одного или нескольких осцилляторов, объединённых по принципу подчинения в автоколебательную систему, а также от синхронного взаимодействия множества автоколебательных систем зависит нормальное функционирование клеток и организма в целом.

На примере осцилляторных систем сердца, соподчинённость которых образует следующую последовательность: *миоциты синусного узла (водитель ритма)*→*миоциты предсердий*→*миоциты желудочков*, легко убедиться, как достоверное представление о взаимоотношениях этих осцилляторов упрощает диагностику нарушений их синхронной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что поиск новых свидетельств, подтверждающих (или отвергающих) участие и, возможно, *руководящую* роль осцилляторной системы RS-NO↔ДНКЖ в генерации ЭП клетки (причём, в разных по происхождению клеточных сообществах, а не только в кардиомиоцитах), может оказаться плодотворным. На такую возможность настраивают и предварительные выводы по результатам настоящей работы.

1. Теснота негативной линейной K-Zn связи, наряду с разнонаправленными сдвигами в МЛГ электрогенных металлов (Ca, K, Na), по всей видимости, отражает активность суперсемейства мембранных АТФаз на фоне окислительного/нитрозативного стресса.

2. В изменениях ЭП клетки, вызываемых трансмембранным перемещением Ca²⁺, K⁺, Na⁺ и активностью АТФаз, нельзя исключить участие ионов нитрозония (NO⁺), генерируемых в системе RS-NO↔ДНКЖ в режиме автокатализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Axelsen K.B., Palmgren M.G (1998) J. Mol. Evol., **46**, 84-101.
2. Argüello J.M. (2003) J. Membrane Biol., **195**, 93-108.
3. Argüello J.M., Eren E. (2007) Biometals, **20**, 233-248.
4. Yano M. (2008) Circ.J., **72**, 509-514.
5. Sun J., Yamaguchi N., Xu L., Eu J.P., Stamler J.S., Meissner G. (2008) Biochemistry, **47**, 13985-13990.
6. Yan Y., Liu J., Weil C., Li K., Xie W., Wang Y., Cheng H. (2008) Cardiovasc. Res., **77**, 432-441.
7. Gyorke S., Terentyev D. (2008) Cardiovasc. Res., **77**, 245-255.
8. Petukhov V.I., Dmitriev E.V., Kalvinsh I., Bauman L.Kh., Reste E.D., Zvagule T., Skesters A.P., Skalny A.V. (2011) Vitamins & Trace Elements, **1**(2), 1-8.
9. Kumerova A.O., Lece A.G., Skesters A.P., Orlikov G.A., Seleznev J.V., Rainsford K.D. (2000) Biol. Trace Element Res., **77**, 1-12.
10. Петухов В.И., Баумане Л.Х., Рестэ Е.Д., Звагуле Т.Я., Романова М.А., Шушкевич Н.И., Сушкова Л.Т., Скавронский С.В., Шуков А.Н. (2012) Бюл. экспер. биол. мед., **154**, 698-700.
11. Bera A.K., Jarque C.M. (1980) Economics Letters, **6**(3), 255-259.
12. Lilliefors H. (1967) Journal of the American Statistical Association, **62**(318), 399-402.
13. Петухов В.И., Дмитриев Е.В., Шкестерс А.П., Скальный А.В. (2006) Микроэлементы в медицине, **7**, 7-14.
14. Davison A.C., Hinkley V.D. (1997) in: Bootstrap methods and their application. Cambridge University, UK.
15. Петухов В.И., Лапарова Е.В. (2007) Микроэлементы в медицине, **8**(4), 51-53.
16. Palmer R.D. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 8428-8430.
17. Otvos J.D., Armitage I.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 7094-7098.
18. Zangger K., Öz. G., Haslinger E., Kunert O., Armitage I.M. (2001) FASEB J., **15**, 1303-1305.
19. Maret W., Vallee B.L. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 3478-3482.
20. Maret W. (1995) Neurochem. Int., **27**, 111-117.
21. Hogg N. (2000) Free Rad. Biol. Med., **28**, 1478-1486.
22. Vanin A.F., Papina A.A., Serezhnikov V.A., Koppenol W.H. (2004) Nitric Oxide, Biol. Chem., **10**, 60-73.
23. Lakatta E.G., Maltsev V.A., Bogdanov K.Y., Stern M.D., Vinogradova T.M. (2003) Circ. Res., **92**, e45-e50.
24. Maltsev V.A., Lakatta E.G. (2007) Heart Lung Circ., **16**, 335-348.
25. Lakatta E.G., Maltsev V.A., Vinogradova T.M. (2010) Circ. Res., **106**, 659-673.
26. Yaniv Y., Maltsev V.A., Escobar A.L., Spurgeon H.A., Ziman B.D., Stern M.D., Lakatta E.G. (2011) J. Mol. Cell. Cardiol., **51**, 902-905.
27. Pinsky D.J., Patton S., Mesaros S., Brovkovich V., Kubaszewski E., Grunfeld S., Malinski T. (1997) Circ. Res., **81**, 372-379.

Поступила: 23. 08. 2013.

NITRIC OXIDE AND ELECTROGENIC METALS (Ca, Na, K) IN EPIDERMAL CELLS

V.I. Petukhov¹, L.K. Bauman², E.V. Dmitriev³, A.F. Vanin⁴

¹Baltic Institute of Psychology,
Riga, Latvia, LV-1003; tel.: (+371) 67100608; fax: (+371) 67100219; e-mail: vip-val@yandex.ru

²Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, Latvia

³Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴A.Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Using atomic emission spectrometry and EPR analysis metal-ligand homeostasis (MLH) has been studied in epidermal cells of 954 liquidators of the Chernobyl accident and 947 healthy individuals. A possible association of the redox status with the quantitative changes in the MLH, which could be used as discriminators of oxidative/nitrosative stress, attracts special interest. Characteristic features of oxidative stress mainly related to electrogenic metals (Ca, K, Na), were found not only among the liquidators examined, but also in some healthy individuals (18.1%); this suggests the presence of oxidative/nitrosative stress of non-radiation origin. Correlation between intracellular production of nitric oxide (NO) with quantitative changes in the electrogenic metals may indicate the possible involvement of NO in the generation of an electric potential of the cell.

Key words: nitric oxide, metal-ligand homeostasis, redox status, epidermis.