

На правах рукописи

КЫРОВ Дмитрий Николаевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОДУЛИРУЮЩИХ ЭФФЕКТОВ ГЕМОЛИЗАТА
ЭРИТРОЦИТОВ НА АКТИВНОСТЬ Na,K-АТФазы**

03.00.04 БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Тюмень - 2006

Работа выполнена на кафедре анатомии и физиологии человека и животных ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Александр Дмитриевич Шалабодов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ирина Викторовна Ральченко

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Татьяна Дмитриевна Журавлева

Ведущая организация

Государственное общеобразовательное учреждение высшего профессионального образования «Челябинская государственная медицинская академия»

Защита состоится «22» декабря 2006 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.274.07 в ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет» по адресу: 625043, г.Тюмень, ул. Пирогова, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тюменского государственного университета.

Автореферат разослан « » _____ 2006г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Е.А. Чирятьев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Na,K-АТФаза является олигомерным интегральным белком плазматической мембраны клеток. Основная функция фермента заключается в сопряженном с гидролизом АТФ переносе ионов натрия из клетки, а ионов калия в клетку (Skou, 1988; Scheiner-Bobis, 2002). В настоящее время Na,K-АТФаза рассматривается не только как система активного транспорта ионов, но и как система рецепции и передачи сигналов в клетку (Лопина О.Д., 2005; Xie et al., 2002).

Существуют кратковременные и долговременные пути регуляции активности фермента (Therien et al., 2000). Эритроциты, являясь высокоспециализированными клетками, не могут реализовывать долговременные механизмы регуляции, так как не имеют в зрелом состоянии белок-синтезирующих систем, поэтому ключевыми становятся кратковременные механизмы регуляции, связанные с уже существующими структурами и метаболическими путями эритроцита. Важная роль в регуляции Na,K-АТФазы эритроцитов принадлежит ионам кальция и магния, которые участвуют в реакционном цикле фермента (Skou, 1988). Рядом авторов выявлено присутствие в мембране эритроцитов белка FXD-2, который способен влиять на сродство Na,K-АТФазы к одновалентным катионам (Hoffman et al., 2002). Следует отметить, что активность фермента может регулироваться белками цитоскелета эритроцитов (Казеннов А.М. и соавт., 1996).

Результатом работы разных авторов явилось обнаружение в эритроцитах веществ, обладающих как активирующим, так и ингибирующим эффектом на активность фермента из различных тканей. В работах Yingst (1985, 1992) было показано, что ингибирующее действие ионов кальция на активность фермента усиливалось присутствием мембранного белка кальнактина, позднее идентифицированного как фрагмент кальмодулина - регулятора активности Ca-АТФазы. В работах других авторов отмечались активирующие эффекты гемолизата, которые зависели от соотношения ионов магния и кальция в средах определения и используемых гемолизирующих растворах (Петруняк А.А. и соавт., 1990).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение модулирующих эффектов гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы головного мозга крысы. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать активность Na,K-АТФазы в гомогенате головного мозга крысы после прединкубации с гемолизатом эритроцитов.

2. С помощью гель-фильтрации фракционировать гемолизат эритроцитов и исследовать влияние полученных фракций на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы.

3. Оценить зависимость модулирующего эффекта гемолизата эритроцитов и его отдельных фракций на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы от содержания в среде определения ферментативной активности ЭДТА и ионов магния и кальция.

Научная новизна. Показано, что гемолизат эритроцитов обладал выраженным ингибирующим влиянием на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы. Степень проявления модулирующего эффекта гемолизата зависела от содержания ЭДТА и соотношения ионов магния и кальция в среде определения ферментативной активности.

Проведено разделение с помощью гель-фильтрации гемолизата эритроцитов на отдельные фракции, три из которых модулировали активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы в зависимости от соотношения двухвалентных ионов в среде инкубации. Впервые показано, что одна из трех модулирующих фракций обладала магнием- и кальций-зависимым ингибирующим эффектом на активность Na,K-АТФазы, а активирующий эффект двух других фракций гемолизата эритроцитов в отношении фермента являлся кальций-зависимым.

Научно-практическая значимость работы. Показано, что в гемолизате эритроцитов и в его отдельных фракциях присутствуют модуляторы активности Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы, степень влияния которых на активность фермента зависит от соотношения двухвалентных ионов (магния и кальция) в среде определения ферментативной активности. Предполагается, что

модулирующим эффектом на активность Na,K-АТФазы могут обладать как белки мембранного скелета эритроцитов (вероятно, спектрин), так и белковые компоненты с приблизительной молекулярной массой 60-70 кДа или низкомолекулярные полипептиды.

Полученные данные расширяют представления о путях регуляции Na,K-АТФазы, что важно в плане понимания механизмов контроля гомеостаза клетки.

Результаты проведенного исследования используются при чтении специализированного курса «Структуры и функции ферментов» студентам Тюменского государственного университета.

Положения, выносимые на защиту:

- Гемолизат эритроцитов, полученный с использованием гемолизирующего раствора, не содержащего ЭДТА, вызывает снижение активности Na,K-АТФазы головного мозга крысы.

- Разделение гемолизата эритроцитов с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 показало наличие в полученных фракциях модуляторов, обладающих ингибирующим и активирующими эффектами в отношении Na,K-АТФазы головного мозга крысы.

- Проявление ингибирующего и активирующих эффектов факторов, содержащихся в гемолизате, на активность Na,K-АТФазы головного мозга определяется наличием и соотношением ионов магния и кальция в среде определения ферментативной активности.

Апробация диссертации. Основные положения диссертации доложены на V Общероссийской научной конференции "Успехи современного естествознания" (Сочи, 2004), Всероссийской конференции молодых исследователей "Физиология и медицина" (С.-Петербург, 2005), IX Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века" (Пущино, 2005), Всероссийской конференции "Менделеевские чтения" (Тюмень, 2005), I Съезде физиологов СНГ (Дагомыс, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 208 источников, в том числе 168 на иностранных языках. Работа изложена на 120 страницах, иллюстрирована 25 рисунками и 2 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на крысах-самцах линии Wistar в возрасте 13-14 недель с массой тела 220-240 г. Предварительно оценивали двигательную активность крыс методом «открытого поля» (Меркель А.Л., 1976). Для дальнейших экспериментов использовались только «активные» крысы.

Смешанную венозно-артериальную кровь получали после декапитации животных. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (150-200 ед/мл). Все исследования проводились в день забора крови. Для получения эритроцитов кровь центрифугировали при 1700 об/мин в течении 5 минут, затем удаляли плазму и лейкоцитарную пленку. Эритроциты трижды промывали охлажденным 0,145 М NaCl на 10 мМ трис-HCl буфере (pH 7,4 при 25°C).

Мозг после декапитации извлекали, на холоду быстро освобождали от оболочек и удаляли белое вещество. Ткань мозга гомогенизировали в 9-кратном объеме 0,25 М сахарозы на 0,02 М трис-HCl буфере (pH 7,4 при 25°C). Ядра и неразрушенные клетки удаляли путем центрифугирования при 3000 об/мин в течении 10 минут. Надосадочную жидкость, представляющую собой грубую микросомально-митохондриальную фракцию, отбирали и в дальнейшем использовали для определения активности Na,K-АТФазы.

Для получения гемолизата эритроцитов использовали гипотонический гемолизирующий раствор, представляющий собой 10 мМ трис-HCl буфер (pH 7,4 при 25°C). Промытые эритроциты помещали в охлажденную колбу с гемолизирующим раствором и выдерживали в течении 10 минут при 5°C. Соотношение объемов упакованных эритроцитов и гемолизирующего раствора составляло 1:4.

Для фракционирования белков гемолизата эритроцитов использовали метод гель-фильтрации на сефадексе G-50. Гемолизат эритроцитов в объеме 1,9 мл наносили на колонку (высота - 200 мм, диаметр - 20 мм), заполненную сефадексом, уравновешенным 10 мМ трис-НСl буфером (рН 7,4 при 25°C). Белки элюировали из колонки раствором 10 мМ трис-НСl буфера (рН 7,4 при 25°C) со скоростью 0,4 мл в минуту.

Прединкубация гомогената головного мозга крысы с полученными фракциями и гемолизатом эритроцитов проводилась при 20°C в течении 30 минут в соотношении 1:19. Контроль представлял собой гомогенат головного мозга после прединкубации с гемолизирующим раствором.

Для определения активности Na,K-АТФазы 0,1 мл исследуемого образца гомогената головного мозга после соответствующей прединкубации вносили в инкубационную среду объемом 0,3 мл. Инкубацию образцов проводили при 37°C в течение 30 минут. Стандартная среда для определения ферментативной активности Na,K-АТФазы содержала в мМ: NaCl — 100, KCl — 20, трис-НСl буфер— 50 (рН 7,6 при 25°C), MgCl₂ - 3, CaCl₂ - 0, ЭДТА — 0,5 и АТФ — 3. При необходимости в условиях эксперимента варьировались концентрации ЭДТА, MgCl₂ и CaCl₂. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл охлажденного 15 % раствора трихлоруксусной кислоты. Осаждение денатурированных белков осуществляли при 3500 об/мин в течении 10 минут.

Содержание неорганического фосфора определяли по методу Чена в модификации Казеннова А.М. и соавт. (1984). Активность Na,K-АТФазы определяли по разности между содержанием неорганического фосфора в отсутствие и присутствии в инкубационной среде 1мМ уабаина и выражали в мкмоль Фн в час на мг белка в гомогенате головного мозга крысы.

Содержание белка определяли по методу Lowry et al (1951).

Электрофоретическое разделение белков проводили в камере для вертикального электрофореза по Lämmli (1970), а окрашивание геля - с использованием цинк-имидазольного метода (Hardy et al., 1996). В качестве

маркерных белков использовали β -лактоглобин – 18,4 кДа, бычий альбумин – 66 кДа, мышечную фосфоорилазу кролика – 97,4 кДа.

В работе были использованы убаин, АТФ, ЭДТА, $MgCl_2$, KCl , $NaCl$, $SnCl_2$, $CaCl_2$, трис- HCl буфер, сефадекс G-50, реактивы для проведения электрофоретического разделения белков и маркерные белки фирмы Sigma, реактив Фолина фирмы Merck, молибдат аммония, аскорбиновая кислота, ТХУ, HCl , H_2SO_4 и гепарин отечественного производства (ч.д.а.)

Полученные данные были обработаны с помощью методов вариационной статистики, сравнение показателей проводилось с использованием t-критерия Стьюдента (Лакин Г.Ф., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние гемолизата эритроцитов на активность Na,K -АТФазы головного мозга крысы.

Согласно литературным данным в эритроцитах млекопитающих присутствует ингибитор Na,K -АТФазы (Yingst, 1988), а также возможно наличие активатора фермента (Петруняка В.В., Панюшкина Е.А., 1994). Высказывались предположения о том, что модуляторы активности могут обладать магний- и кальций-зависимыми свойствами. Учитывая это, изучали влияние гемолизата эритроцитов на активность Na,K -АТФазы гомогената головного мозга крысы в зависимости от содержания в среде определения ферментативной активности ЭДТА, $MgCl_2$ и $CaCl_2$. Na,K -АТФаза головного мозга крысы была выбрана в качестве объекта исследования, поскольку обладает высокой активностью по сравнению с ферментом эритроцитов, что, как предполагалось, позволит более выражено выявить модулирующие эффекты гемолизата эритроцитов.

Результаты исследования показали, что гемолизат эритроцитов, полученный при соотношении упакованных эритроцитов к гемолизирующему раствору 1:4, ингибировал Na,K -АТФазу головного мозга на 40%, в то время как при соотношениях 1:9 и 1:19 не влиял на активность исследуемого фермента (рис.1).

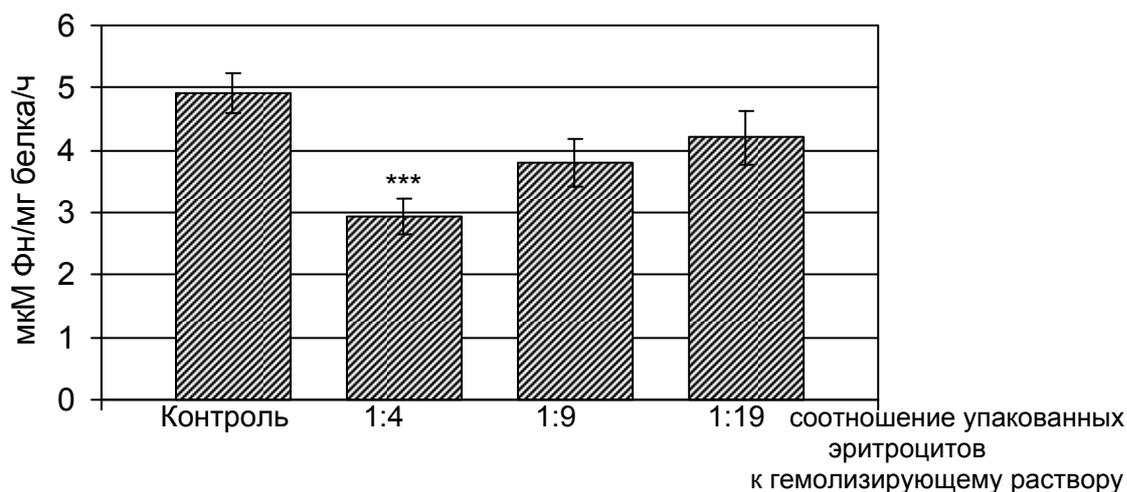


Рис. 1 Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы после прединкубации с гемолизатом эритроцитов

Примечание: ***- $p < 0,001$ - достоверность различий по сравнению с контролем
 Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (pH 7,6 при 25°C); MgCl₂ – 3; CaCl₂ – 0; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=6).

Также было показано, что увеличение содержания ЭДТА в среде определения ферментативной активности приводило к снижению ингибирующего эффекта гемолизата эритроцитов с 40% при 0,5 мМ до 22% при 2 мМ (табл.1).

Таблица 1

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации ЭДТА в среде определения ферментативной активности до и после прединкубации с гемолизатом эритроцитов, (M±m)

ЭДТА, мМ	контроль	опыт
0,5	4,91±0,25	2,93±0,28***
1,0	4,14±0,25	2,87±0,26**
2,0	3,57±0,26##	2,78±0,23*

Примечание: * - $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ - достоверность различий по сравнению с контролем

- $p < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с активностью фермента в среде, содержащей 0,5 мМ ЭДТА

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (pH 7,6 при 25°C); MgCl₂ – 3; CaCl₂ – 0; ЭДТА- (0,5;1;2); АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

Следует отметить, что в контроле увеличение концентрации ЭДТА приводило к снижению активности Na,K-АТФазы гомогената головного мозга, что, скорее всего, связано с хелацией двухвалентных ионов магния, который является важным регулятором активности фермента. Однако в опыте связывание ионов магния ЭДТА не приводило к изменению активности фермента, что, по-

видимому, обусловлено тем, что в гемолизате эритроцитов присутствуют факторы, которые снижают чувствительность фермента к низким концентрациям ионов магния.

На следующем этапе исследовали влияние высоких концентраций $MgCl_2$ в бескальциевой среде на ингибирование Na,K -АТФазы гомогената головного мозга крысы гемолизатом эритроцитов при 0,5 мМ ЭДТА (табл. 2).

Таблица 2

Активность Na,K -АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации $MgCl_2$ в среде определения ферментативной активности до и после прединкубации с гемолизатом эритроцитов, ($M \pm m$)

$MgCl_2$, мМ	контроль	опыт
3	4,91±0,25	2,93±0,28 ***
6	4,80±0,27	2,71±0,26 ***
12	4,23±0,27	2,56±0,25 ***

Примечание: *** - $p < 0,001$ - достоверность различий по сравнению с контролем

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: $NaCl$ -100; KCl - 20; трис- HCl - 50 (рН 7,6 при 25°C); $MgCl_2$ – (3,6,12); $CaCl_2$ – 0; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 ($t=37^\circ C$) ($n=7$).

Результаты исследования показали, что ингибирующий эффект гемолизата эритроцитов на активность фермента сохранялся при всех исследованных концентрациях $MgCl_2$ в среде определения ферментативной активности.

Таким образом, гемолизат эритроцитов ингибировал Na,K -АТФазу гомогената головного мозга крысы как при низких, так и при высоких концентрациях $MgCl_2$ в среде определения ферментативной активности.

Изучение влияния различных концентраций $CaCl_2$ на активность Na,K -АТФазы гомогената головного мозга после прединкубации с гемолизатом эритроцитов показало, что при высокой концентрации $CaCl_2$ (1 мМ) в среде определения ферментативной активности ингибирующий эффект гемолизата эритроцитов отсутствовал (табл.3).

Таблица 3

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации CaCl₂ в среде определения ферментативной активности до и после прединкубации с гемолизатом эритроцитов, (M±m)

CaCl ₂ , мМ	контроль	опыт
0	4,91±0,25	2,93±0,28***
0,1	4,63±0,26	2,80±0,24***
1,0	2,63±0,21###	2,05±0,26#

Примечание: ***-p<0,001 - достоверность различий по сравнению с контролем

- p<0,05; ### - p<0,001 – достоверность различий по сравнению с активностью фермента в бескальциевой среде.

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – 3; CaCl₂ – (0;0,1;1); ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

В связи с отсутствием ингибирующего эффекта гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга при высокой концентрации CaCl₂, исследовали влияние содержания MgCl₂ в среде определения ферментативной активности при разных концентрациях CaCl₂ на ингибирование фермента гемолизатом эритроцитов. Известно, что ионы кальция конкурируют с ионами магния с образованием кальций-фосфофермента (Post, 1984). Показано, что в среде, содержащей 0,1 мМ CaCl₂, ингибирующий эффект гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга сохранялся при всех исследованных концентрациях MgCl₂ в среде определения ферментативной активности (табл. 4), в то время как при высокой концентрации CaCl₂ (1 мМ) ингибирующий эффект проявлялся только при увеличении содержания MgCl₂ до 6 мМ и 12 мМ (табл. 5).

Таблица 4

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации MgCl₂ в среде определения ферментативной активности, содержащей 0,1 мМ CaCl₂, до и после прединкубации с гемолизатом эритроцитов, (M±m)

CaCl ₂ , мМ	MgCl ₂ , мМ	контроль	опыт
0,1	3	4,63±0,26	2,80±0,24 ***
	6	4,44±0,30	2,50±0,23 ***
	12	3,97±0,27	2,44±0,23 **

Примечание: **-p<0,01; *** - p<0,001 - достоверность различий по сравнению с контролем

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – (3,6,12); CaCl₂ – 0,1; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

Таблица 5

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации MgCl₂ в среде определения ферментативной активности, содержащей 1 мМ CaCl₂, до и после прединкубации с гемоллизатом эритроцитов, (M±m)

CaCl ₂ , мМ	MgCl ₂ , мМ	контроль	опыт
1,0	3	2,63±0,21	2,05±0,26
	6	3,13±0,23	2,24±0,24*
	12	3,57±0,22##	2,69±0,27*

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с контролем

- $p < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с активностью фермента в среде, содержащей 3 мМ MgCl₂.

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – (3, 6, 12); CaCl₂ – 1; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

Кроме того, обращает внимание тот факт, что в контроле при высоких концентрациях CaCl₂ в среде определения ферментативной активности с увеличением содержания MgCl₂ от 3 до 12 мМ происходило повышение активности Na,K-АТФазы гомогената головного мозга. Ионы кальция и магния, а также их комплексы с АТФ конкурируют за центры связывания с ферментом. Согласно данным Post (1984) кальций относительно легко диссоциирует из комплекса с фосфоферментом. По-видимому, увеличение содержания MgCl₂ в среде определения ферментативной активности приводит к вытеснению ионов кальция ионами магния из центров связывания фермента, в результате чего активность Na,K-АТФазы головного мозга повышается.

Таким образом, ингибирующий эффект гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы проявлялся при низкой концентрации CaCl₂ в среде определения ферментативной активности, а при высокой концентрации CaCl₂ проявление эффекта зависело от соотношения концентраций ионов магния и кальция.

Полученные результаты позволяют предположить, что ингибирование Na,K-АТФазы головного мозга крысы гемоллизатом эритроцитов обусловлено присутствием в гемоллизате факторов, действие которых зависит от соотношения двухвалентных ионов в среде определения ферментативной активности. В следующей серии экспериментов было поведено разделение гемолизата эритроцитов на отдельные фракции с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-

50 и изучено влияние этих фракции на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы.

2. Разделение гемолизата эритроцитов на отдельные фракции с помощью гель-фильтрации.

В результате проведенного фракционирования гемолизата эритроцитов было получено 11 фракций. Данные по исследованию влияния отдельных фракций после элюции гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы представлены на рис.2.

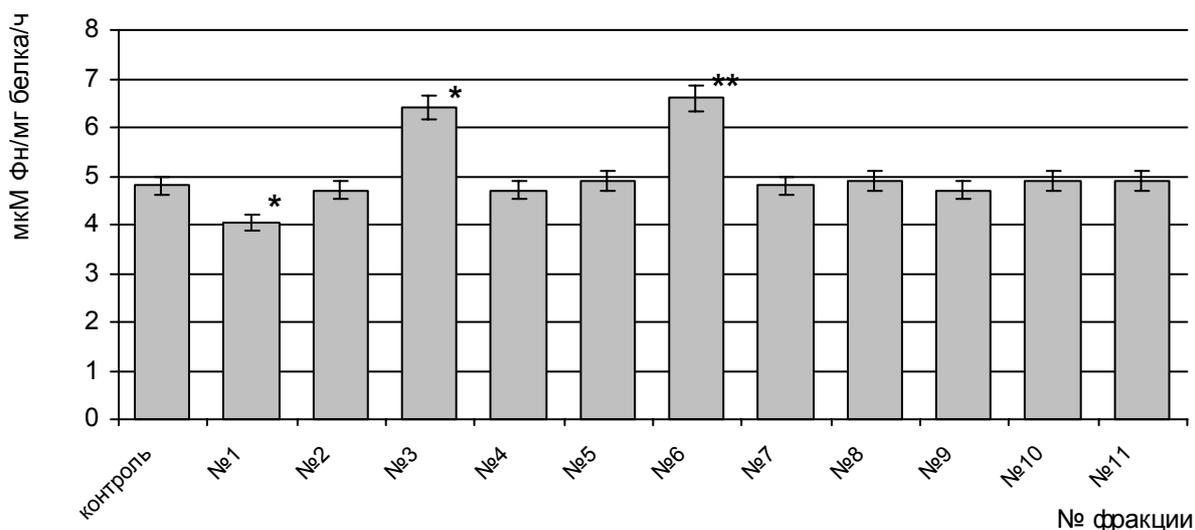


Рис.2 Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы до и после прединкубации с фракциями, полученными в результате элюции гемолизата эритроцитов

Примечание: *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$ - достоверность различий по сравнению с контролем

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl-20; трис-HCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – 3; CaCl₂ – 0; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

Видно, что после прединкубации гомогената головного мозга крысы с фракцией №1 активность Na,K-АТФазы снижалась на 18%, а после прединкубации с фракциями №3 и №6 активность фермента, напротив, повышалась на 31% и 35% соответственно.

Результаты электрофоретического анализа отдельных модулирующих фракций представлены на рис.3.

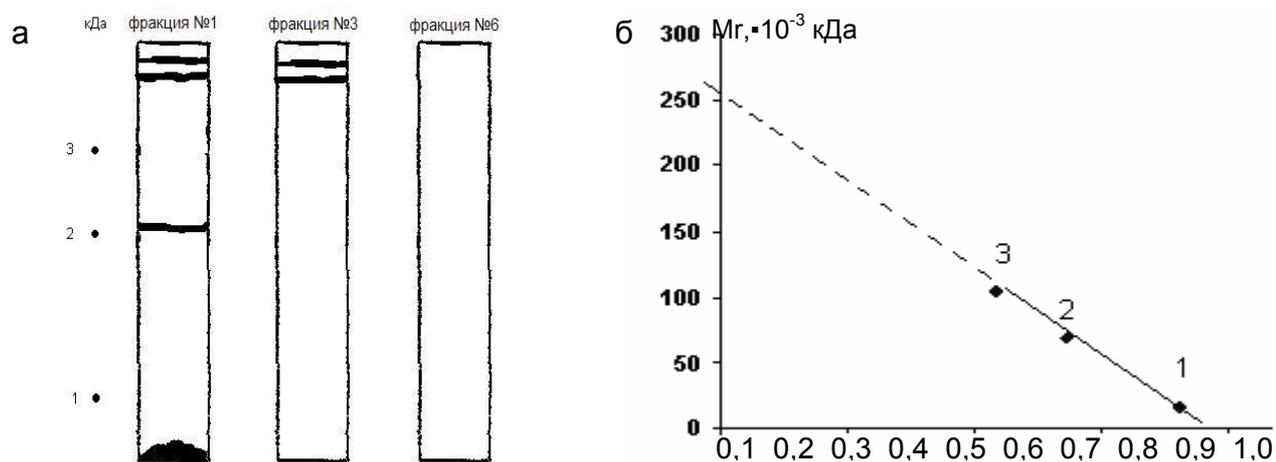


Рис.3 Схемы электрофореграмм модулирующих фракций гемолизата эритроцитов (а) и калибровочный график для определения молекулярной массы белков после электрофореза в ПААГ (б)

Примечание: маркерные белки: β -лактоглобин – 18,4 кДа (1), бычий альбумин – 66 кДа (2), мышечная фосфоорилаза кролика – 97,4 кДа (3).

При использовании маркерных белков было определено, что во фракции №1 содержались белки с примерной молекулярной массой 230-260 кДа (предположительно, субъединицы спектрина), белок с молекулярной массой 60-70 кДа и низкомолекулярные белки. Во фракции №3 отмечено присутствие только белков с примерной молекулярной массой 230-260 кДа. Во фракции №6 с помощью электрофореза белков не выявлено, что, скорее всего, связано с низким содержанием белка в данной фракции. Таким образом, полученные отдельные фракции гемолизата различались не только по модулирующим эффектам на активность Na,K-АТФазы головного мозга, но и имели разный набор белков.

На следующем этапе исследования было изучено влияние полученных фракций гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы.

3. Влияние отдельных фракции гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы головного мозга крысы.

В табл. 6 представлены результаты исследования зависимости активности Na,K-АТФазы гомогената головного мозга после прединкубации с полученными

фракциями от концентрации ЭДТА в среде определения ферментативной активности.

Показано, что фракции №3 и №6 активировали Na,K-АТФазу головного мозга при определении активности фермента в средах, содержащих 0,5 мМ и 1 мМ ЭДТА.

Таблица 6

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации ЭДТА в среде определения ферментативной активности до и после прединкубации с полученными фракциями гемолизата эритроцитов, (M±m)

ЭДТА, мМ	контроль	после прединкубации с фракцией №1	после прединкубации с фракцией №3	после прединкубации с фракцией №6
0,5	4,89±0,22	4,05±0,20 *	6,40±0,46 *	6,61±0,49 **
1,0	4,17±0,23	3,68±0,25	5,60±0,32 **	5,64±0,29 **
2,0	3,59±0,22 ##	3,34±0,28	3,57±0,25###	3,45±0,23###

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - достоверность различий по сравнению с контролем
- $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ – достоверность различий по сравнению с активностью фермента в среде, содержащей 0,5 мМ ЭДТА

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – 3; CaCl₂ – 0; ЭДТА- (0,5;1;2); АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

Ингибирующий эффект фракции №1 на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга проявлялся только при низкой концентрации ЭДТА (0,5 мМ). Поскольку увеличение содержания ЭДТА в среде приводит к снижению концентрации ионов магния в результате хелации, то можно предположить, что отсутствие ингибирующего эффекта фракции №1 в средах, содержащих 1 мМ и 2 мМ ЭДТА, связано с магнием-зависимым механизмом ингибирования.

Изучение влияния содержания MgCl₂ на модулирующие эффекты полученных фракций гемолизата эритроцитов показало, что повышение концентрации MgCl₂ в среде определения ферментативной активности приводило к устранению ингибирующего эффекта фракции №1. В тоже время, повышение содержания MgCl₂ в среде определения ферментативной активности не влияло на активацию фермента головного мозга фракциями №3 и №6 (табл.7).

Таблица 7

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации MgCl₂ в среде определения ферментативной активности до и после прединкубации с полученными фракциями гемолизата эритроцитов, (M±m)

MgCl ₂ , mM	контроль	после прединкубации с фракцией №1	после прединкубации с фракцией №3	после прединкубации с фракцией №6
3	4,89±0,22	4,05±0,20 *	6,40±0,46*	6,61±0,49**
6	4,81±0,28	4,53±0,26	6,18±0,40*	6,12±0,38*
12	4,21±0,25	4,18±0,25	6,05±0,34***	6,01±0,31***

Примечание: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 - достоверность различий по сравнению с контролем

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – (3,6,12); CaCl₂ – 0; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

Кроме того, было обнаружено, что модулирующие эффекты фракций №1, №3 и №6 в отношении Na,K-АТФазы гомогената головного мозга не проявлялись при внесении в среду определения ферментативной активности CaCl₂ (табл. 8). Отмечено, что после прединкубации гомогената головного мозга с фракциями №3 и №6 активность фермента снижалась при внесении в среду определения ферментативной активности 0,1 мМ CaCl₂ по сравнению с активностью в бескальциевой среде. В опыте с фракцией №1 снижение активности Na,K-АТФазы гомогената головного мозга по сравнению с активностью фермента в бескальциевой среде происходило только при высокой концентрации CaCl₂. Можно предположить, что модуляторы из фракций №3 и №6, активирующие фермент гомогената головного мозга, более чувствительны к присутствию ионов кальция, чем модуляторы из фракции №1, обладающие ингибирующим эффектом.

Таблица 8

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации CaCl₂ в среде определения ферментативной активности до и после прединкубации с полученными фракциями гемолизата эритроцитов, (M±m)

CaCl ₂ , mM	контроль	после прединкубации с фракцией №1	после прединкубации с фракцией №3	после прединкубации с фракцией №6
0	4,89±0,22	4,05±0,20 *	6,40±0,46*	6,61±0,49**
0,1	4,65±0,26	4,23±0,29	4,56±0,30##	4,57±0,23##
1,0	3,10±0,21 ####	2,45±0,23 ####	2,49±0,22####	2,53±0,21####

Примечание: * - p<0,05; ** - p<0,01 - достоверность различий по сравнению с контролем
- p<0,01; #### - p<0,001 – достоверность различий по сравнению с активностью фермента в бескальциевой среде

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – 3; CaCl₂ – (0, 0.1, 1); ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

Согласно литературным данным между кальций-зависимыми активаторами и ингибиторами в эритроцитах существуют конкурентные взаимоотношения, и способность их проявлять свою активность определяется соотношением в цитозоле клетки ионов магния и кальция (Петруняка В.В. и соавт., 1990). В связи с этим, проводили изучение активности Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы после прединкубации с фракциями гемолизата эритроцитов в зависимости от содержания MgCl₂ при низких и высоких концентрациях CaCl₂ в среде определения ферментативной активности.

Показано, что при низкой концентрации CaCl₂ (0,1 мМ) активирующий эффект фракции №6 в отношении Na,K-АТФазы головного мозга вновь проявлялся только в среде определения ферментативной активности, содержащей 6 мМ MgCl₂ (табл.9).

Таблица 9

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации MgCl₂ в среде определения ферментативной активности, содержащей 0,1 мМ CaCl₂, до и после прединкубации с полученными фракциями гемолизата эритроцитов, (M±m)

CaCl ₂ , мМ	MgCl ₂ , мМ	контроль	после прединкубации с фракцией №1	после прединкубации с фракцией №3	после прединкубации с фракцией №6
0,1	3	4,65±0,26	4,23±0,29	4,56±0,30	4,57±0,23
	6	4,48±0,29	4,12±0,23	4,52±0,21	5,31±0,19*
	12	3,94±0,24	4,01±0,25	4,06±0,28	4,29±0,25

Примечание: *-p<0,05 - достоверность различий по сравнению с контролем

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НCl- 50 (рН 7,6 при 25°С); MgCl₂ – (3,6,12); CaCl₂ – 0,1; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°С) (n=7).

При высокой концентрации CaCl₂ (1 мМ) в среде определения ферментативной активности модулирующих эффектов фракций №1, №3 и №6 на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга не наблюдалось (табл.10). Однако в контроле и опыте с фракциями №3 и №6 при увеличении содержания MgCl₂ активность Na,K-АТФазы головного мозга повышалась по сравнению с активностью фермента при 3 мМ MgCl₂. Как было отмечено ранее, при высоких концентрациях ионов кальция в среде возможно образование кальций – фосфофермента (Post, 1984), и увеличение концентрации ионов магния может

приводить к вытеснению ионов кальция из фосфофермента, с чем, по-видимому, и связано повышение активности Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы.

Таблица 10

Активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы (мкМ Фн/мг белка/ч) в зависимости от концентрации MgCl₂ в среде определения ферментативной активности, содержащей 1 мМ CaCl₂, до и после прединкубации с полученными фракциями гемолизата эритроцитов, (M±m)

CaCl ₂ , мМ	MgCl ₂ , мМ	контроль	после прединкубации с фракцией №1	после прединкубации с фракцией №3	после прединкубации с фракцией №6
1,0	3	2,62±0,22	2,45±0,23	2,49±0,22	2,53±0,21
	6	3,10±0,21	2,64±0,19	3,22±0,22#	3,21±0,22#
	12	3,50±0,21 ##	2,98±0,22	3,53±0,24##	3,41±0,25#

Примечание: # - p<0,05;## - p<0,01 – достоверность различий по сравнению с активностью фермента в среде, содержащей 3 мМ MgCl₂

Среда определения ферментативной активности содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-HCl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂ – (3,6,12); CaCl₂ – 1; ЭДТА- 0,5; АТФ- 3 (t=37°C) (n=7).

После прединкубации с фракцией №1, как и в опыте с гемолизатом эритроцитов, активность фермента с увеличением содержания MgCl₂ при 1 мМ CaCl₂ в среде определения ферментативной активности не изменялась по сравнению с активностью при 3 мМ MgCl₂. Это позволяет предположить, что модуляторы фракции №1, не проявляя ингибирующего эффекта, оказывают влияние на фермент, которое выражается в изменении чувствительности фермента к действию ионов магния.

Изменение содержания MgCl₂ и внесение CaCl₂ в среду определения ферментативной активности приводило к снятию ингибирующего эффекта фракции №1, что позволяет предположить кальций- и магний-зависимые свойства модуляторов. Повышение концентрации MgCl₂ в среде определения ферментативной активности не влияло на активирующие эффекты фракции №3 и №6, тогда как присутствие CaCl₂ устраняло модулирующие эффекты, что указывает на кальций-зависимые свойства модуляторов.

Учитывая результаты электрофореза, можно предположить, что ингибирующий эффект фракции №1 обусловлен действием белка с примерным

молекулярным весом 60-70 кДа или низкомолекулярными белками. Активирующий эффект фракции №3, вероятно, обусловлен спектрином, часть которого, по-видимому, удаляется с цитоплазматической поверхности мембраны эритроцитов уже в процессе гемолиза. Высказанное предположение хорошо согласуется с литературными данными о кальций-зависимом механизме активации транспортных АТФаз белками цитоскелета (Казеннов А.М., и соавт., 1996). Активирующий эффект фракции №6, возможно, связан с присутствием низкомолекулярных кальций-зависимых факторов (Фролова О.В., 1996).

ВЫВОДЫ

1. Активность Na,K-АТФазы в гомогенате головного мозга крысы после прединкубации с гемолизатом эритроцитов снижалась на 40 % по сравнению с контролем в стандартной среде определения ферментативной активности. Изучение влияния ЭДТА и ионов магния и кальция на процесс ингибирования Na,K-АТФазы головного мозга крысы гемолизатом эритроцитов показало, что действие внутриклеточных модуляторов на Na,K-АТФазу зависит от соотношения двухвалентных ионов в среде определения ферментативной активности.

2. Полученные с помощью гель-фильтрации отдельные фракции гемолизата эритроцитов обладали разнонаправленными эффектами на Na,K-АТФазу гомогената головного мозга крысы, что указывает на присутствие в гемолизате эритроцитов ингибиторов и активаторов фермента.

3. Результаты исследования влияния отдельных фракций гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы головного мозга крысы в зависимости от содержания двухвалентных ионов в среде определения ферментативной активности указывают на наличие в эритроцитах модуляторов активности фермента с магний- и кальций-зависимыми свойствами, так и только с кальций-зависимыми свойствами.

4. Совокупность полученных результатов позволяет предположить, что влияние гемолизата эритроцитов на активность Na,K-АТФазы гомогената головного мозга крысы и характер зависимости этого влияния от двухвалентных ионов обусловлены взаимодействием внутриклеточных модуляторов фермента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дубровский В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Шалабодов А.Д. Активность Na^+, K^+ -АТФазы и ацетилхолинэстеразы в различных отделах головного мозга крыс при иммобилизационном стрессе различной продолжительности// Материалы 5 Общероссийской научной конференции "Успехи современного естествознания" г.Сочи 27-29 сентября 2004г. Успехи современного естествознания - №8. – 2004. – С.41-42.
2. Кыров Д.Н. Регуляция активности Na, K - АТФазы гемоллизатом эритроцитов крыс// Сборник материалов Всероссийской конференции молодых исследователей "Физиология и медицина" 14-16 апреля 2005 г., г. Санкт-Петербург. Приложение к журналу "Вестник молодых ученых". Серия "Науки о жизни". - С. 65.
3. Дубровский В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Шалабодов А.Д. Активность Na, K - АТФазы головного мозга и эритроцитов крыс при стрессе// Материалы Всероссийской конференции "Менделеевские чтения" 26-28 мая 2005 г., г. Тюмень. - С.126-129.
4. Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Дубровский В.Н., Шалабодов А.Д. Исследование действия модуляторов, выделенных из эритроцитов, на активность Na, K -АТФазы головного мозга крыс// Научные труды I Съезда физиологов СНГ 19-23 сентября 2005 г., г. Сочи, Дагомыс, Т.2. - С. 52.
5. Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Дубровский В.Н., Шалабодов А.Д. Влияние гемолизата эритроцитов на активность Na, K -АТФазы головного мозга крыс// Вестник Тюменского государственного университета, №5 – 2006. – С. 4-12.

Подписано в печать 20.11.2006. Тираж 100 экз.
Объем 1,0 уч.-изд. л. Формат 60x84/16. Заказ 677.

Издательство Тюменского государственного университета
625000, г. Тюмень, ул. Семакова, 10.
Тел./факс (3452) 45-56-60, 46-27-32
E-mail: izdatelstvo@utmn.ru