

БИОПОГИЯ

*Дмитрий Николаевич КЫРОВ —
ассистент кафедры анатомии и физиологии
человека и животных*

*Елена Анатольевна СИЛИВАНОВА —
аспирант кафедры анатомии и физиологии
человека и животных*

*Виталий Николаевич ДУБРОВСКИЙ — доцент
кафедры анатомии и физиологии человека
и животных, кандидат биологических наук*

*Александр Дмитриевич ШАЛАБОДОВ —
профессор кафедры анатомии и физиологии
человека и животных, доктор биологических наук*

УДК 577.15

ВЛИЯНИЕ ГЕМОЛИЗАТА ЭРИТРОЦИТОВ НА АКТИВНОСТЬ Na, K-АТФАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ*

АННОТАЦИЯ. С помощью гель-филтрации гемолизата эритроцитов крыс получены три фракции, модулирующие активность Na, K-АТФазы головного мозга. Исследовано влияние ЭДТА, ионов магния и кальция в среде определения ферментативной активности на модулирующие эффекты фракций.

By means of gel-filtration of rats red blood cell hemolysate is received three fractions modulating activity Na, K-ATPase of brain. Influence of EDTA, ions of magnesium and calcium in the medium of definition enzymatic activity on modulating effects of fractions is investigated.

Введение

Na, K-АТФаза является олигомерным интегральным белком плазматической мембраны клеток. Основная функция фермента заключается в поддержании внутриклеточного гомеостаза одновалентных катионов [1]. В настоящее время Na, K-АТФаза рассматривается не только как система активного транспорта ионов, но и как система рецепции и передачи сигналов [2]. Было обнаружено, что специфические ингибиторы фермента убаин и дигиталис-подобные факторы

*Работа выполнена при финансировании гранта «Поддержка аспирантов и молодых ученых ТюмГУ» (приказ № 344 от 05.07.06).

могут синтезироваться в тканях животных и выполнять функцию гормонов [3]. Существуют кратковременные и долговременные пути регуляции активности фермента [4]. Большой интерес представляют процессы фосфорилирования различными протеинкиназами отдельных участков каталитической субъединицы фермента и их участие в эндогенной регуляции активности [5]. Общеизвестна роль особого класса белков (FXYD-белков), участвующих в регуляции каталитической активности Na, K-АТФазы [6].

Целью данной работы явилось исследование действия эндогенных модуляторов эритроцитов крысы на активность Na, K-АТФазы головного мозга и влияния ЭДТА, ионов магния и кальция в среде определения ферментативной активности на возможные модулирующие эффекты.

Методы исследования

Исследование проводилось на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 13-14 недель с массой тела 220-240 г. 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 течение 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 оборотах в минуту в течение 10 минут. Надосадочную жидкость 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 (pH 7,4 при 25°C). Промытые эритроциты помещали в охлажденную колбу с гемолизирующим раствором и выдерживали в течение 10 мин. при 5°C. Соотношение объемов эритроцитов и гемолизирующего раствора составляло 1:4.

Для фракционирования белков гемолизата использовали метод гель-фильтрации на сефадексе G-50. 1,9 мл гемолизата наносили на колонку, заполненную сефадексом (высота — 200 мм, диаметр — 20 мм), уравновешенным 10 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4). Белки элюировали из колонки гемолизирующим раствором со скоростью 0,4 мл в минуту.

Предынкубация гомогената с фракциями элюированных белков и гемолизатом проводилась при 20°C в течении 30 минут в соотношении 1:19. Контроль представлял собой гомогенат, инкубированный с гемолизирующим раствором.

Для определения активности АТФаз 0,1 мл исследуемого образца гомогената головного мозга после соответствующей предынкубации вводили в инкубационную среду объемом 0,3 мл. Инкубацию образцов проводили при 37°C в течение 30 минут. Стандартная инкубационная среда для определения активности АТФаз содержала в мМ: Na⁺-100, K⁺-20, трис-HCl-50 (pH 7,6 при 25°C), Mg²⁺-3, Ca²⁺-0, ЭДТА-0,5 и АТФ-3. При необходимости в условиях эксперимента соотношение ЭДТА, ионов магния и кальция варьировалось. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл охлажденного 15% раствора трихлоруксусной кислоты. Осаждение денатурированных белков осуществляли при 3500 оборотах в минуту в течение 10 минут.

Содержание неорганического фосфора определяли по методу Чена в модификации А. М. Казеннова и соавторов [7]. Активность Na, K-АТФазы определяли по разности между содержанием неорганического фосфора в присутствии и

присутствии в инкубационной среде 1мМ уабаина и выражали в мкмоль Фн в час на мг белка.

Содержание белка определяли по методу Lowry [8].

Электрофоретическое разделение белков проводили в камере для вертикального электрофореза по Laemmli [9], а окрашивание геля — с использованием цинк-имидазольного метода. В качестве маркерных белков использовали β -лактоглобин — 18,4 кДа, бычий альбумин — 66 кДа, мышечную фосфоорилазу кролика — 97,4 кДа.

Полученные данные были обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что в зрелых эритроцитах присутствует кальций — зависимый ингибитор, ранее называемый кальнактином, идентифицированный позднее как фрагмент кальмодулина [10], ингибирующий эффект которого коррелирует с действием ионов кальция. Однако в более поздних работах показано проявление активирующего эффекта гемолизата на активность транспортных АТФаз из различных источников, важную роль в котором играют белки цитоскелета [11].

Нами показано, что после предынкубации гомогената головного мозга крысы с гемолизатом эритроцитов активность Na, K-АТФазы снижалась на 35% по сравнению с контролем. Не исключено, что при гемолизе эритроцитов в растворах с низкой ионной силой происходит удаление с цитоплазматической стороны мембраны эритроцитов белков цитоскелета, которые могут модулировать активность Na, K-АТФазы.

Для проверки данного предположения было проведено фракционирование гемолизата эритроцитов и электрофоретический анализ полученных фракций.

Фракционирование белков гемолизата на колонке, заполненной сефадексом G50, показало, что модулирующей активностью обладали три фракции: фракция «1» обладала ингибирующим действием на Na, K-АТФазу головного мозга крысы, а фракции «3» и «6» — активирующим (рис. 1).

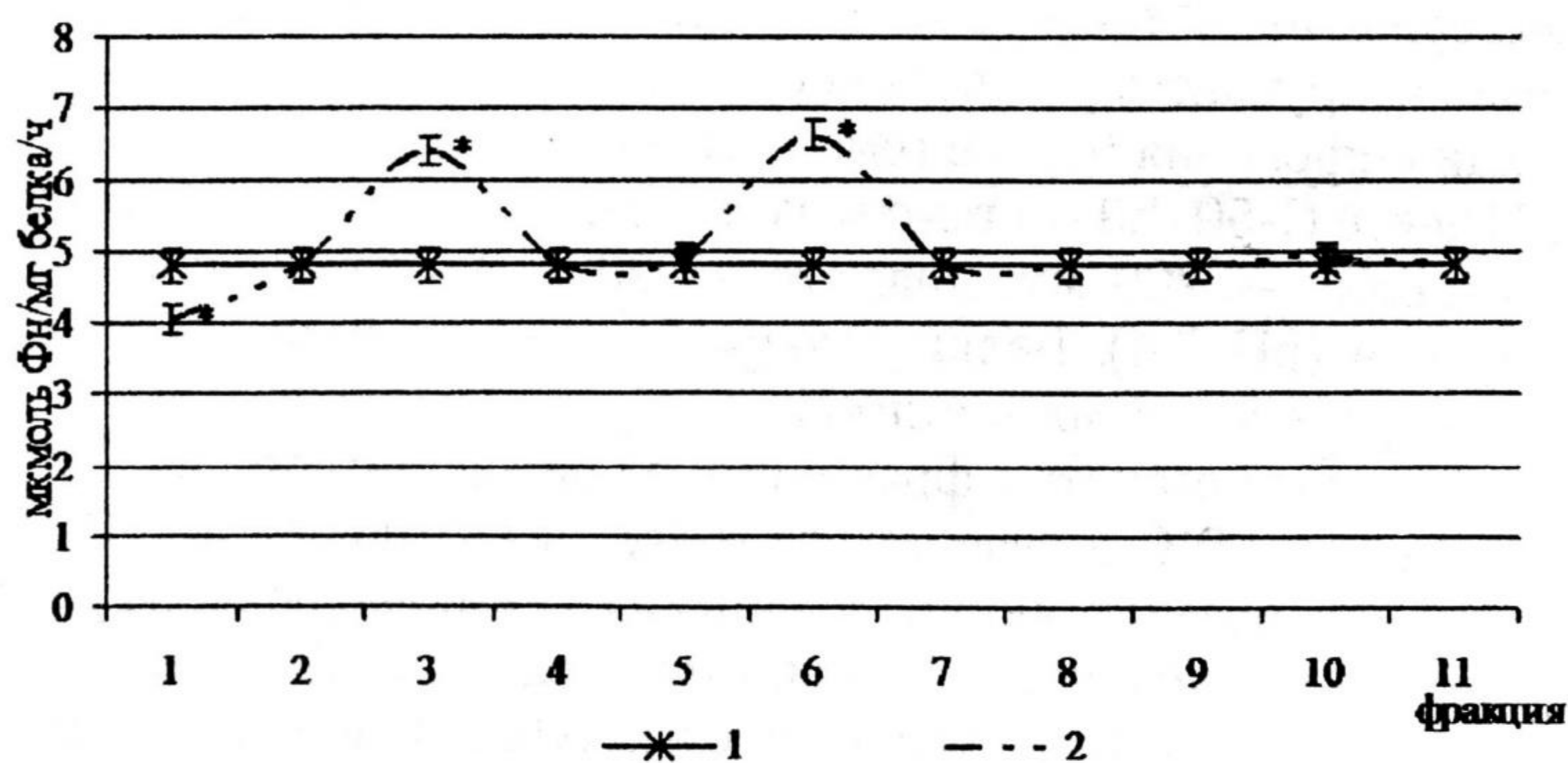


Рис. 1. Активность Na, K-АТФазы головного мозга крысы в контроле (1) и после предынкубации с фракциями, полученными в результате элюции белков гемолизата (2) (n=7).

Примечание: * — $p < 0.05$ — достоверность различий по сравнению с контролем
Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl-100; KCl-20;
трис-HCl-50 (pH 7,6 при 25°C); MgCl₂ — 3; CaCl₂ — 0;
ЭДТА — 0,5; АТФ-3. (t=37°C).

Электрофоретический анализ позволил обнаружить присутствие белка в ингибирующей и первой активирующей фракциях (рис. 2). После оценки молекулярного веса было предположено наличие в обеих фракциях субъединиц спектрина — белка цитоскелета. Во второй модулирующей фракции с помощью элек-

трофореза не выявлено наличие белка, что связано, по-видимому, с тем, что эта фракция содержит низкомолекулярные пептидные соединения. По данным Hoffmann [12] в мембране эритроцитов человека присутствуют $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$ субъединицы Na, K-АТФазы, а также γ -субъединица (FXUD-2) из семейства низкомолекулярных FXUD-белков. Возможно, что модулирующий эффект, наблюдаемый в опыте, обусловлен взаимодействием фермента с γ -субъединицей, которая уменьшает сродство Na, K-АТФазы к ионам натрия [13]. Также рядом авторов показано присутствие в головном мозге белка FXUD-7, который снижает сродство фермента к ионам калия вне клетки [14].

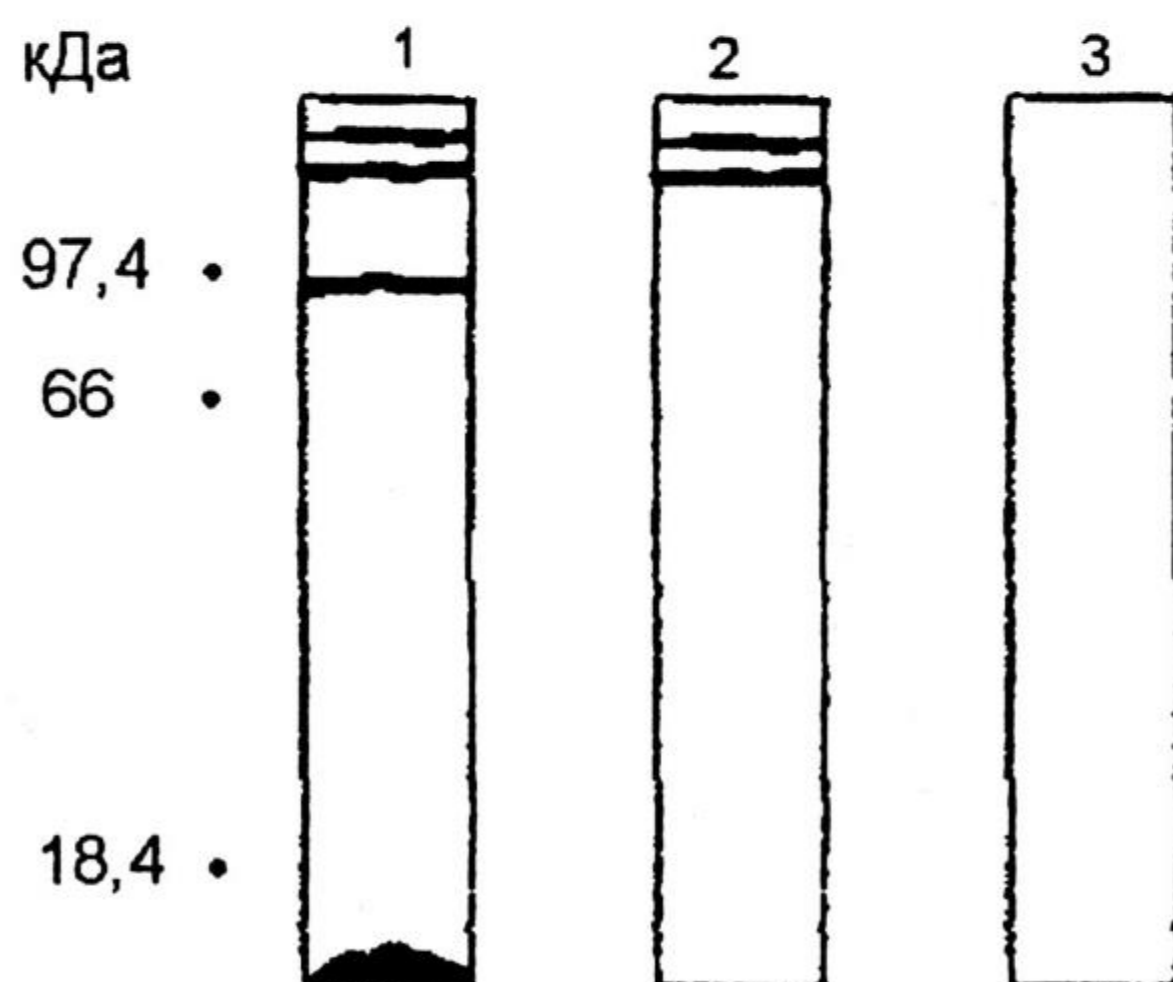


Рис. 2. Схема электрофореграммы фракций гемолизата эритроцитов крысы:
1 — фракция «1», 2 — фракция «3», 3 — фракция «6»

Примечание: маркерные белки: β -лактоглобин — 18,4 кДа,
бычий альбумин — 66 кДа, мышечная фосфоорилаза кролика — 97,4 кДа.

Известно, что модулирующие на фермент эффекты зависят от концентрации в среде двухвалентных ионов [11], в связи с этим была определена активность Na, K-АТФазы головного мозга после предынкубации с гемолизатом и его фракциями в средах определения активности фермента, содержащих различные концентрации ЭДТА, ионов магния и кальция. Известно, что ионы магния участвуют в регуляции конформационных переходов фермента, а ионы кальция обладают разноплановыми эффектами на активность Na, K-АТФазы [15]. ЭДТА может связывать ионы кальция, высвобождающиеся в процессе гемолиза из эритроцитов, и таким образом снижать влияние этих ионов на модулирующие эффекты гемолизата и его фракций.

Результаты исследований показали, что при увеличении концентрации ЭДТА в среде определения ферментативной активности с 0,5 до 2 ммоль/л наблюдалось снижение активности исследуемого фермента, как в контроле, так и опыте с гемолизатом и его фракциями. Ингибирующий эффект гемолизата сохранялся при концентрации ЭДТА равной 1 ммоль/л. В аналогичных условиях ингибирующий эффект фракции «1» не наблюдался. Увеличение концентрации ЭДТА до 1 ммоль/л в среде определения ферментативной активности вызывало снижение активирующего эффекта фракций «3» и «6», приводя к его полному исчезновению при концентрации ЭДТА 2 ммоль/л (рис. 3).

Известно, что при повышении концентрации ионов магния в среде определения ферментативной активности общая АТФазная активность снижается [15]. Нами показано, что при увеличении концентрации ионов магния в среде определения ферментативной активности с 3 до 12 ммоль/л как в контроле, так и в опыте активность Na, K-АТФазы головного мозга крысы не изменялась, однако в бескальциевой среде модулирующие эффекты как фракций, так и гемолизата сохранялись (Рис. 4-6).

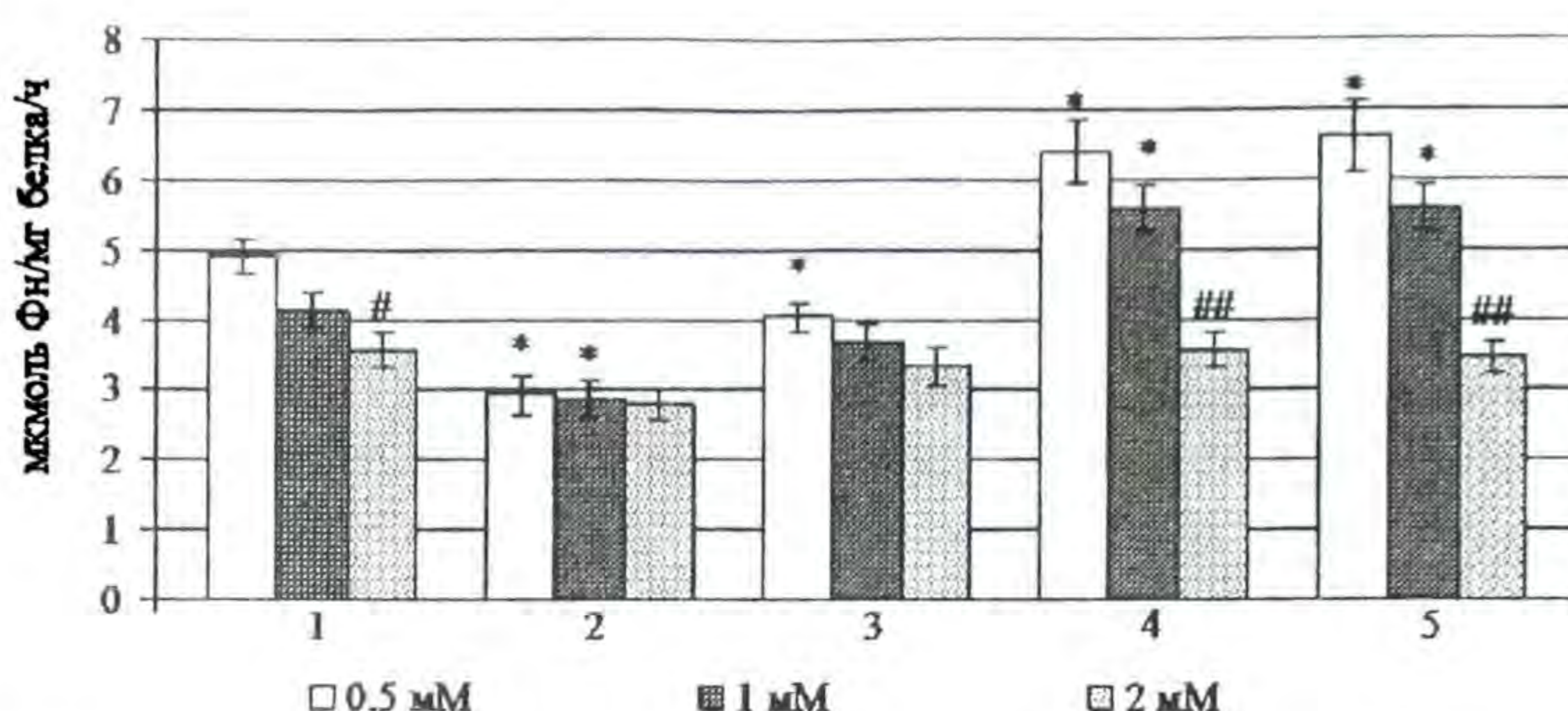


Рис. 3. Активность Na, К-АТФазы головного мозга крысы в контроле (1) и после предынкубации с гемолизатом (2), фракцией «1» (3), фракцией «3» (4) и фракцией «6» (5) в средах, содержащих различные концентрации ЭДТА (n=7).

Примечание: * - $p < 0.05$ — достоверность различий по сравнению с контролем
- $p < 0.05$ — достоверность различий активности фермента по сравнению с активностью фермента в среде, содержащей 0,5 мМ ЭДТА
Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НСl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂-3; CaCl₂-0; ЭДТА- (0,5; 1; 2); АТФ- 3.

С увеличением концентрации ионов кальция в среде определения ферментативной активности, как в контроле, так и в опыте активность Na, К-АТФазы головного мозга снижалась. При концентрации кальция 0,1 ммоль/л в среде определения ферментативной активности в опыте с активирующими и ингибирующей фракциями показано исчезновение модулирующих эффектов (табл. 1).

Таблица 1

Активность Na, К-АТФазы головного мозга крысы в контроле и после предынкубации с модулирующими фракциями гемолизата в средах, содержащих различные концентрации ионов кальция, мкМ Фн/мг белка/час ($M \pm m$) (n=7)

Ca ²⁺ , мМ \ N фракции	0	0.1	0.5	1.0	1.5
контроль	4,91±0,25	4,63±0,26	3,85±0,21	2,63±0,21#	1,84±0,15##
«1»	4,05±0,20*	4,23±0,29	3,56±0,26	2,65±0,23#	1,50±0,13##
«3»	6,40±0,46*	4,56±0,30#	3,91±0,25#	2,49±0,22##	2,01±0,26##
«6»	6,61±0,49*	4,57±0,23#	3,91±0,24#	2,56±0,21##	1,76±0,12##

Примечание: * - $p < 0.05$ — достоверность различий по сравнению с контролем
- $p < 0.05$; ## - $p < 0.01$ — достоверность различий активности фермента по сравнению с активностью фермента в бескальциевой среде.
Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НСl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂-3; CaCl₂- (0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5); ЭДТА- 0,5; АТФ- 3.

В присутствии высоких концентраций ионов кальция в среде определения ферментативной активности (1,5 ммоль/л) увеличение концентрации ионов магния в контроле и в опыте приводило к повышению активности Na, К-АТФазы. Возможно, это связано с конкуренцией ионов кальция за центр связывания с ионами магния или натрия (Рис. 4). Следует отметить отсутствие при данных концентрациях кальция модулирующих эффектов фракций и гемолизата.

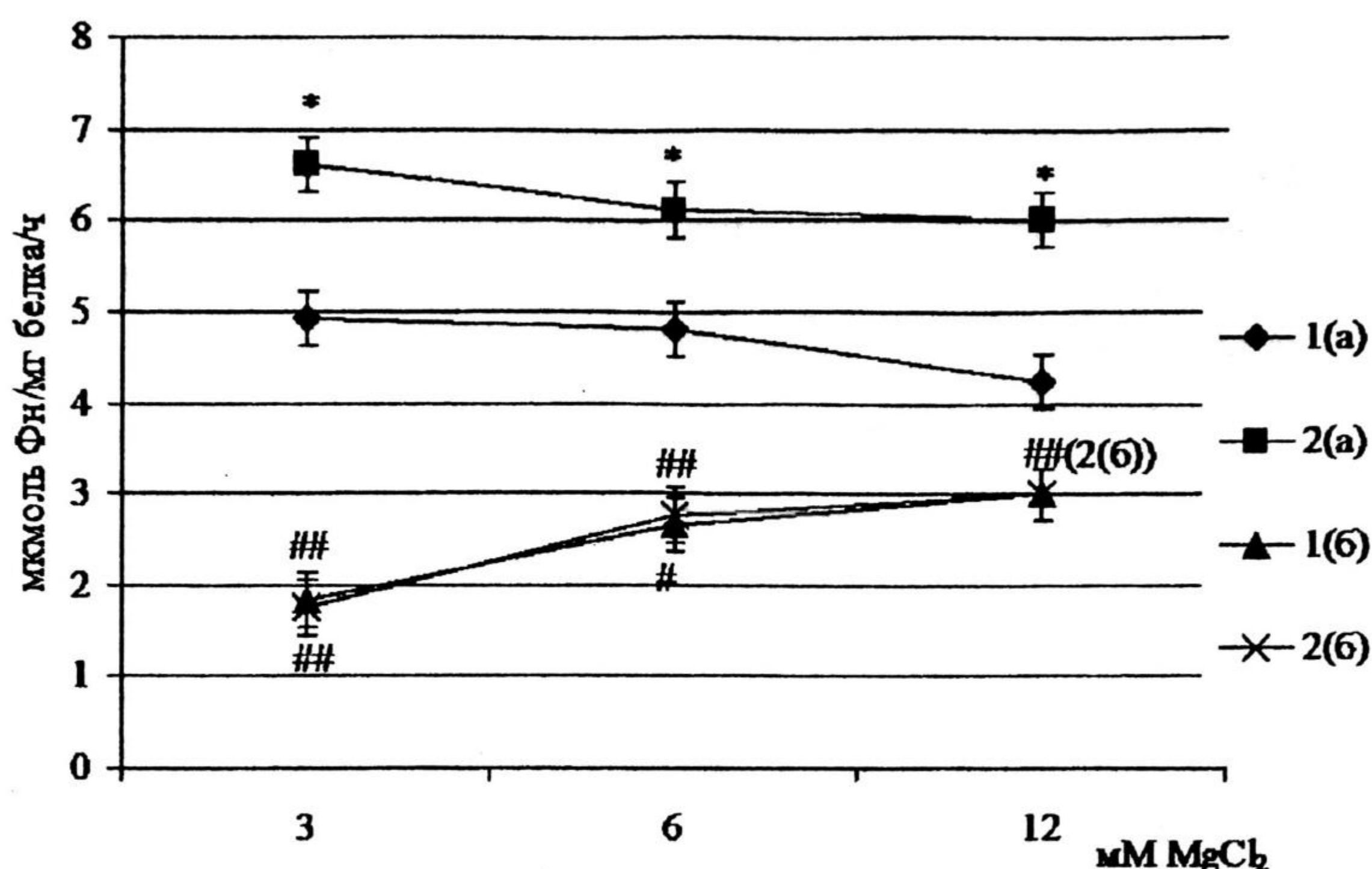


Рис. 4. Активность Na, К-АТФазы головного мозга крысы в контроле и после предынкубации с фракцией «6» (2) в средах, не содержащих ионы кальция (а) и содержащих 1,5 мМ CaCl₂ (б), в присутствии различных концентраций ионов магния (n=7).

Примечание: * - $p < 0.05$ — достоверность различий по сравнению с контролем
- $p < 0.05$; ## - $p < 0.01$ — достоверность различий активности фермента по сравнению с активностью фермента в бескальциевой среде. Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НСl- 50 (рН 7,6 при 25°C); MgCl₂- (3;6;12); CaCl₂- (0;1,5); ЭДТА- 0,5; АТФ- 3.

При анализе активности Na, К-АТФазы головного мозга крысы после предынкубации с гемоллизатом эритроцитов с увеличением концентрации ионов магния в среде определения ферментативной активности, содержащей ионы кальция в концентрации 0,1 ммоль/л, отмечено сохранение ингибирующего эффекта (рис. 5), но при более высоких концентрациях ионов кальция эффект исчезал. Это может указывать на участие в формировании ингибирующего эффекта комплекса факторов, в частности, действие модуляторов (ингибиторов), высвобождающихся при гемоллизе.

Активирующий эффект вновь проявляется в опыте с фракцией «6» в присутствии в среде определения ферментативной активности ионов магния в концентрации 6 ммоль/л и ионов кальция — 0,1 ммоль/л (рис. 6). Возможно, что при данных концентрациях ионов фермент восстанавливает свою чувствительность к активирующим компонентам фракции «6» или, что тоже не исключено, активирующий эффект зависит от конформационного состояния Na, К-АТФазы.

Заключение

Механизмы эндогенной регуляции Na, К-АТФазы разнообразны по своей природе. Содержание субъединиц спектрина в модулирующих фракциях гемолизата указывает на возможную роль белков цитоскелета в регуляции активности Na, К-АТФазы. В присутствии различных концентраций ионов кальция и магния в среде определения ферментативной активности наблюдались определенные изменения в модулирующих эффектах фракций. Возможно, существует взаимосвязь между модулирующим эффектом фракции «6», не содержащей белки цитоскелета, и особенностями реакционного цикла Na, К-АТФазы в присутствии ионов кальция 0,1 ммоль/л и ионов магния 6 ммоль/л в среде определения ферментативной активности. Ингибирующий эффект гемолизата на активность исследуемого фермента сохранялся при увеличении концентрации

ионов магния в среде определения ферментативной активности, содержащей ионы кальция (0,1 ммоль/л).

Однако при более высоких концентрациях ионов кальция в среде определения ферментативной активности модулирующие эффекты гемолизата и его фракций не наблюдались. Это может указывать как на кальций-зависимые свойства модуляторов, так и на изменение чувствительности фермента к ингибирующему действию двухвалентных ионов.

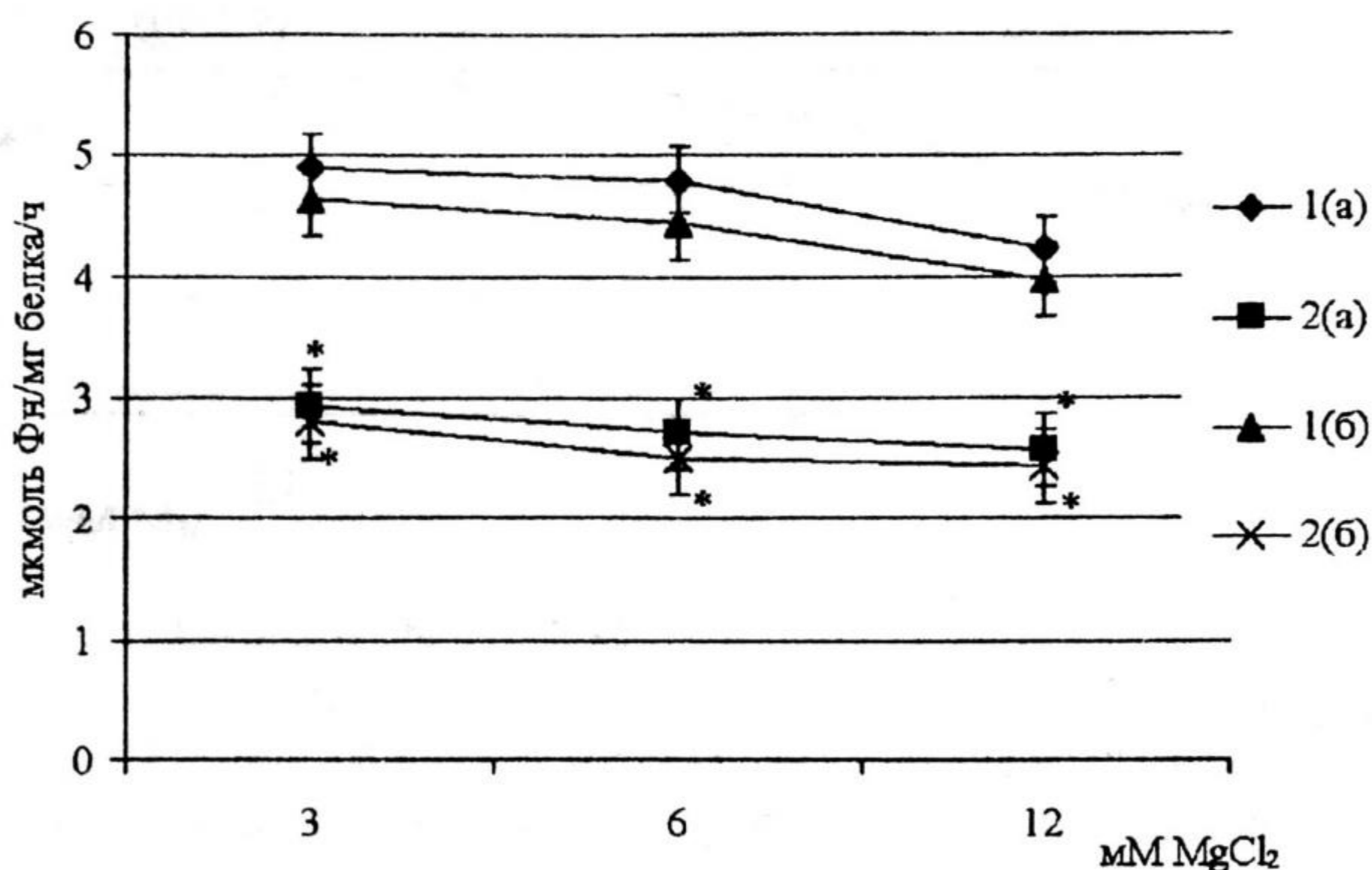


Рис. 5. Активность Na, К-АТФазы головного мозга крысы в контроле (1) и после предынкубации с гемолизатом (2) в средах, не содержащих ионы кальция (а) и содержащих 0,1 мМ CaCl₂ (б), в присутствии различных концентраций ионов магния (n=7)

Примечание: *- p<0.05 — достоверность различий по сравнению с контролем
 #- p<0.05 — достоверность различий активности фермента по сравнению с активностью фермента в бескальциевой среде.
 Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НСl- 50 (рН 7,6 при 25°С); MgCl₂ — (3; 6; 12); CaCl₂ — (0;0,1); ЭДТА-0,5; АТФ-3.

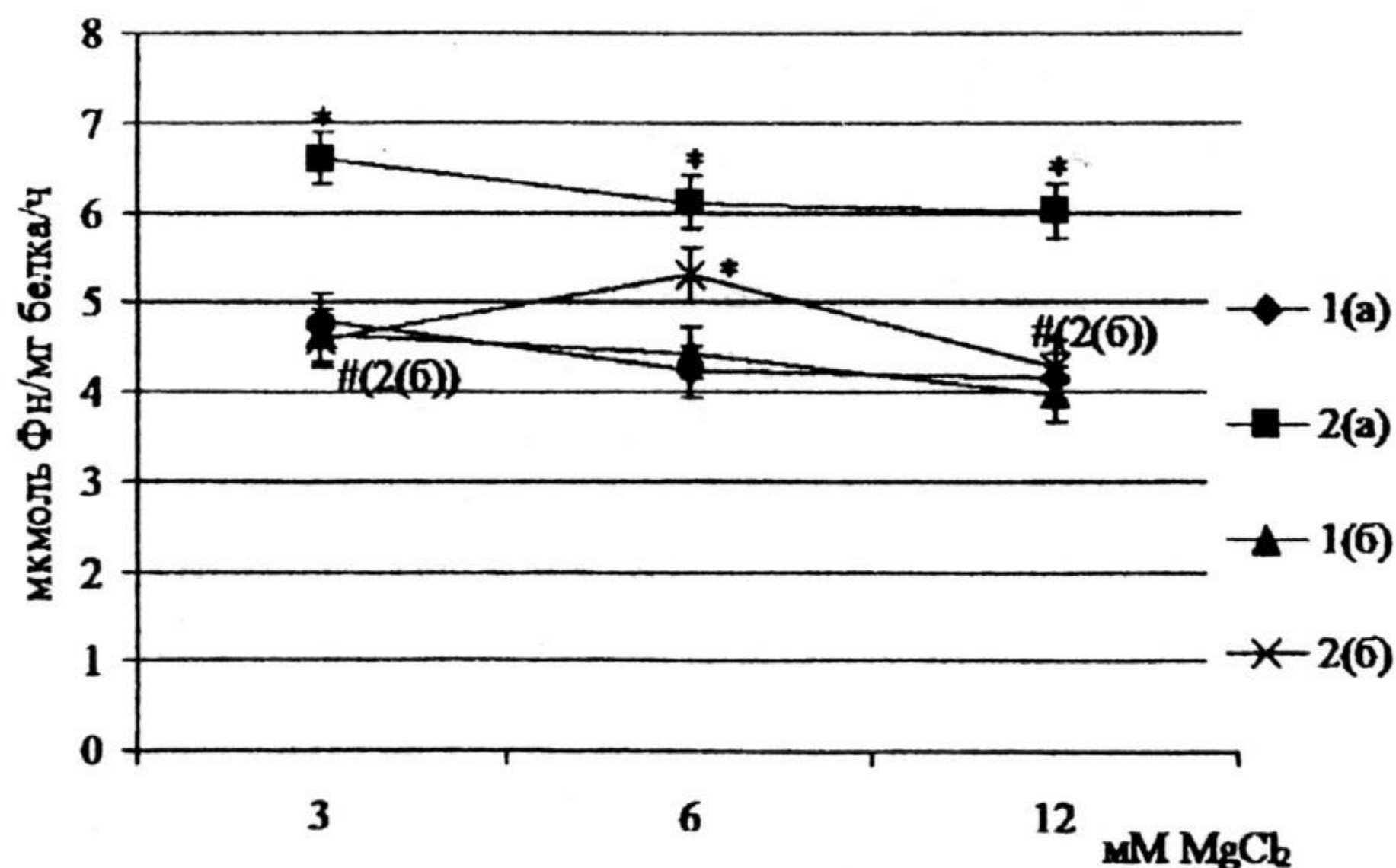


Рис. 6. Активность Na, К-АТФазы головного мозга крысы в контроле и после предынкубации с фракцией «6» (2) в средах, не содержащих ионы кальция (а) и содержащих 0,1 мМ CaCl₂ (б), в присутствии различных концентраций ионов магния (n=7)

Примечание: *- p<0.05 — достоверность различий по сравнению с контролем
 # - p<0.05 — достоверность различий активности фермента по сравнению с активностью фермента в бескальциевой среде.
 Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl-100; KCl- 20; трис-НСl- 50 (рН 7,6 при 25°С); MgCl₂ — (3; 6; 12); CaCl₂ — (0; 0,1); ЭДТА- 0,5; АТФ- 3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics // Eur. J. Biochem. 2000. V. 269. P. 2424-2433.
2. Xie Z., Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 2434-2439.
3. Лопина О. Д. Na, К-АТФаза и сердечные гликозиды: новые функции известного белка // Рос. физиол. журн. им. И. И. Сеченова. 2005. № 2. С. 158-168.
4. Therien A. G, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2000. V. 279. P.541-566
5. Feschenko M. S., Stevenson E., Sweadner K. J. Interaction of Protein Kinase C and cAMP-dependent Pathways in the Phosphorylation of the Na, K-ATPase // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 34693-34700.
6. Geering K. et al. FXYD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators Na, K-ATPase // Ann. NY Acad. Sci. 2003. V. 986. P. 388-394.
7. Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д. Исследование активности Na, К-АТФазы в эритроцитах млекопитающих // Биохимия. 1984. Т. 49. вып. 7. С. 1089-1095.
8. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
10. Yingst D.R. et al. Calmodulin increases Ca-dependent inhibition of the Na, K-ATPase in human red blood cells // Arch. Biochem. Biophys. 1992. V. 295(1). P. 49-54.
11. Казеннов А. М. и соавт. Влияние белков мембранного скелета на частные реакции Na, К-АТФазы эритроцитов млекопитающих // Журн. эвол. физиол. и биох. 1996. Т. 32. № 4. С. 393-401.
12. Hoffman J. F. et al. Na pump isoforms in human erythroid progenitor cells and mature erythrocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002 V. 99 (22). P. 14572-14577.
13. Zouzoulas A. et al. Modulation of Na, K-ATPase by the γ -Subunit // J. Biol. Chem. 2003, Vol. 278. P. 40437-40441.
14. Li C. et al. Role of the transmembrane domain of FXYD7 in structural and functional interactions with Na, K-ATPase // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 2738-2743.
15. Кравцов А. В., Кравцова В. В. Регуляция Na⁺, К⁺-АТФазы: эффекты ионов Mg и Ca // Укр. біохім. журн. 2001. Т. 73. № 2. С. 5-27.