

ВПЛИВ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ НА АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТІВ ТА КЛІТИН МОЗКУ ЩУРІВ

О. І. Харченко¹, Л. І. Богун¹, В. О. Чайка¹, О. І. Долішняк², В. В. Сторожук¹

1 - Київський національний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра біохімії, НДЛ «Фізико-хімічної біології», e-mail: rigik1979@mail.ru

2 - Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Коломийський інститут, e-mail: oksanamchk@ukr.net

Проаналізовано дані сучасної літератури щодо впливу етанолу на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичних мембран. Доведено, що отримані нами зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази при введенні оцтовокислого цинку при хронічній алкогольній інтоксикації можуть бути викликані змінами фосфоліпідного складу плазматичних мембран, інтенсивності процесів ПОЛ, активності протеїнази та порушеннями у гормональному статусі за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

Ключові слова: етанол, мембрани, інтоксикація.

Harchenko O. I., Bogun L. I., Chaika V. O., Dolishniak O. I., Storozhuk V. V. The influence of zinc oxalate on Na^+ , K^+ -ATP-ase activity of plasmatic membranes of hepatocytes and brain cells of the rats. The results of the modern studies of the influence of the ethyl alcohol on Na^+ , K^+ -ATP-ase activity of plasmatic membranes was analysed. It was proved that got by us change of Na^+ , K^+ -ATP-ase activity when entering the zinc oxalate by chronic alcohol intoxication may be caused change the phospholipid composition of plasmatic membranes, intensive POL, proteinase activity and breaches hormones status at condition chronic alcoholic intoxication.

Key words: ethanol, membrane, intoxication.

Вступ

Плазматичні мембрани не лише беруть участь у підтриманні клітинної цілісності, а й виконують ряд різноманітних функцій в клітині. Зокрема, з мембранами зв'язані важливі ферменти, що забезпечують виконання численних функцій в клітині та забезпечують нормальну життєдіяльність.

Відомо, що як продукти ПОЛ, так і фосфоліпідний склад впливають на структуру і функції плазматичних мембран, що призводить до порушення функціонування маркерних ферментів. Ці ензими можуть виступати в ролі біохімічних мішеней, що обумовлюють, з одного боку, пошкоджуючий ефект етанолу, а з іншого – пристосування організму до алкоголізації.

На сьогодні немає однозначної відповіді щодо впливу етанолу на функціонування основних мембранозв'язаних ферментів, зокрема Na^+ , K^+ -АТФ-ази, яка приймає участь у розподілі катіонів натрію та калію між клітиною і міжклітинним середовищем і, таким чином, відіграє важливу роль в забезпеченні нормальної життєдіяльності організму.

Можна припустити, що попередньо встановлене нами порушення фосфоліпідного оточення внаслідок дезорганізуючого впливу етанолу на плазматичні мембрани може призвести до порушення механізму вбудовування інтегральних білків-транспортів, зокрема Na^+ , K^+ -АТФ-ази у мембрани. Поліпептидні ділянки, що складаються, як правило, з гідрофобних амінокислот при вбудовуванні даної АТФ-ази повинні практично повністю занурюватись у мембрану. Припускаємо, що механізм вбудовування АТФ-ази у мембрану буде залежати і від активності конвертази, тобто ферменту, який здатний відщеплювати поліпептидну ділянку білка. Синтез ферменту залежить від функціонування гормональної системи, яка, як відомо, порушується під час алкогольної інтоксикації. Передача сигналу для синтезу і активації Na^+ , K^+ -АТФ-ази знаходиться у тісному взаємозв'язку з вторинними посередниками, а також іонами, що створюють мембранний потенціал, зокрема Na^+ , K^+ , Cl^- та ін.

Визначення змін у функціонуванні зазначеного ензиму плазматичних мембран гепатоцитів та клітин мозку дозволить краще зрозуміти біохімічний механізм тривалого впливу етанолу на життєдіяльність цих клітин та оцінити можливий протекторний ефект іонів цинку. Тому метою нашої роботи було визначити вплив оцтовокислого цинку на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази в плазматичних мембранах гепатоцитів та клітинах мозку щурів в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

Результати та обговорення

При дослідженні дії етанолу на активність Na^+ , K^+ - АТФ-ази плазматичних мембран гепатоцитів щурів нами було встановлено її зростання на 4-ту (на 25%) та 7-му доби (на 50%), зниження на 11-ту добу (на 36,4%) та повторне підвищення активності ферменту на 16-ту (у 2,5 рази) та 21-шу (у 5 разів) доби експерименту в порівнянні з контролем (рис.1).

Введення оцтовокислого цинку за умов хронічної алкогольної інтоксикації призводило до зростання активності досліджуваного ферменту плазматичних мембран гепатоцитів щурів на 7-му добу (на 40%) і 16-ту добу (на 15%) у порівнянні з контрольними значеннями, у той час як на 4-ту та 11-ту доби цей показник не відрізнявся від контрольних значень. Під час останнього етапу дослідження (21-ша доба) активність Na^+ , K^+ - АТФ-ази була в 2,5 рази вищою в порівнянні з контрольними показниками (рис. 1).

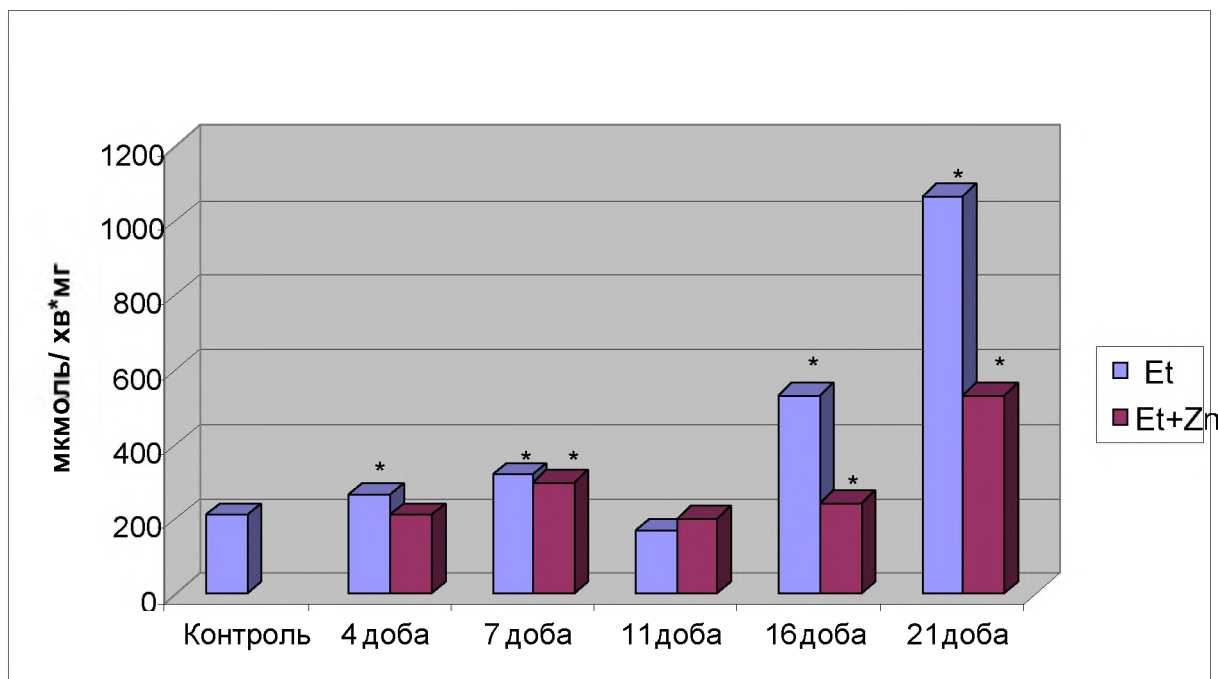


Рис. 1. Активність Na^+ , K^+ - АТФази плазматичних мембран гепатоцитів щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

(* $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем)

Таким чином, оцтовокислий цинк призводить до зменшення впливу етанолу на досліджуваний фермент плазматичних мембран гепатоцитів щурів, знижуючи активність цього ферменту. При введенні оцтовокислого цинку при дії етанолу спостерігається зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази у порівнянні з відповідними етапами за умов алкогольної інтоксикації на початкових термінах (на 4-ту і 7-му доби – на 20% і 7%, відповідно), а також на останніх етапах експерименту (на 16-ту та 21-шу доби – на 54% та 50%, відповідно), в той час як на 11-ту добу експерименту спостерігається незначне підвищення активності ензиму.

На відміну від гепатоцитів, у клітинах мозку при хронічній алкоголізації було виявлено зниження активності Na^+ , K^+ - АТФ-ази плазматичних мембран на більш ранніх етапах дослідження на 4-ту, 7-му та 11-ту доби (у 3, 16 та 5 разів, відповідно) в порівнянні з контролем. В подальшому спостерігалось різке зростання активності ферменту на 16-ту та 21-шу доби експерименту (в 3 і 3,3 рази, відповідно) порівняно з контролем (рис. 2).

За умов хронічної алкогольної інтоксикації введення оцтовокислого цинку призводило до зниження активності досліджуваного ферменту плазматичних мембран клітин мозку щурів на 4-ту, 7-му та 11-ту доби дослідження порівняно з контролем (у 3, 20 і 15 разів, відповідно). На 21-шу добу активність Na^+ , K^+ - АТФ-ази зростала в 1,8 разів по відношенню до контрольних значень. В порівнянні з відповідними строками при дії етанолу активність даного ензиму на 11-ту, 16-ту і 21-шу доби була відповідно в 3, 2,8 та 1,8 разів нижчою.

Na^+ , K^+ - АТФ-аза (АТФ-фосфогідролаза, КФ 3.6.1.37) – інтегральний білок плазматичних мембран клітин, який здійснює енергозалежне протилежно спрямоване перенесення іонів Na^+ та K^+ . Na^+ , K^+ - АТФ-аза залучена до численних клітинних функцій і процесів, пов'язаних з існуванням іонних градієнтів, зокрема до забезпечення електричної збудливості нервової та м'язової тканин [1,2]. В той же час продемонстровано, що при різних патологічних станах спостерігається інактивація Na^+ , K^+ - АТФ-ази [3]. Причиною цього може бути або пряма дія на фермент, або структурні зміни в мембрані (наприклад, внаслідок вільнорадикальних

процесів при церебральній ішемії, сублетальному іонізуючому опроміненні), або багаторівневі порушення тканинспецифічних клітинних механізмів регуляції активності та експресії ізоферментів Na^+, K^+ -АТФ-ази при різних хронічних патологічних станах [1,4].

Відомо, що етанол викликає зниження текучості мембран. Згідно даних ряду авторів остання супроводжується посиленням активного трансмембранного транспорту Na^+ у результаті збільшення числа переносників і зростання їх спорідненості до цього іону, а також стабілізації внутрішньо- та позаклітинного обміну Ca^{2+} . Зменшення в'язкості мембран викликає адаптивне підвищення вмісту холестерину в мембранах клітин печінки та змінює агрегатний стан мембран в області іонних каналів і місцях фіксації білкових молекул [4].

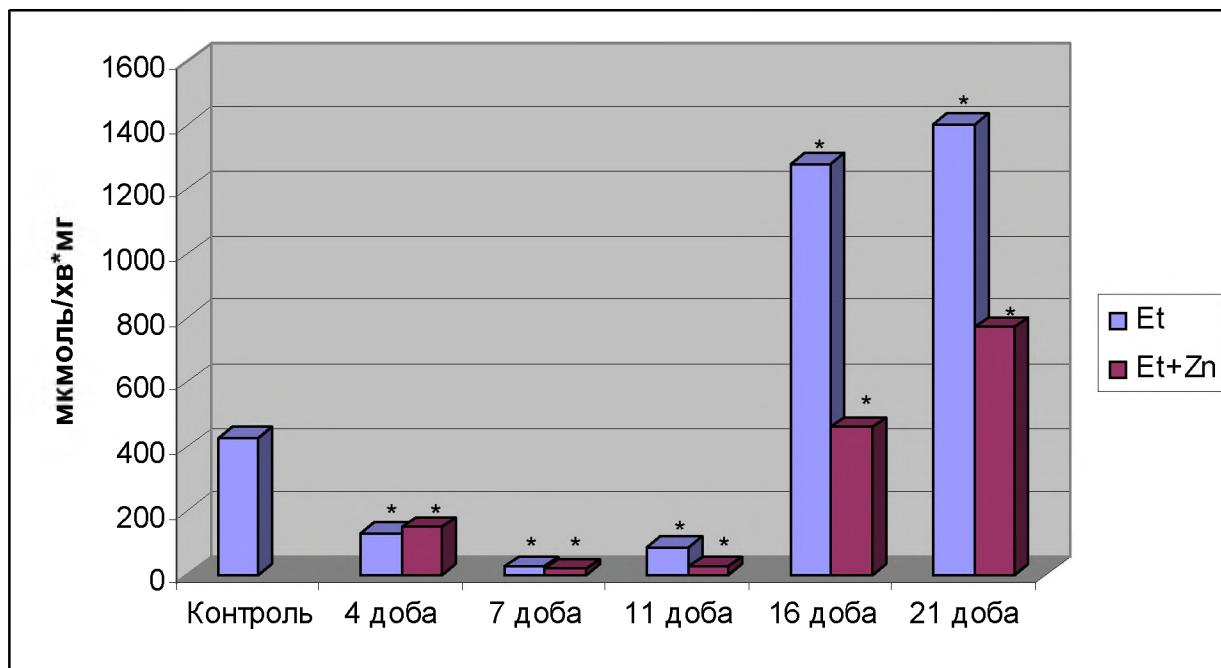


Рис. 2. Активність Na^+, K^+ - АТФази плазматичних мембран клітин мозку щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

(* $P \leq 0,05$ у порівнянні з контролем)

Існуючі на сьогодні дані щодо впливу етанолу на активність Na^+, K^+ - АТФ-ази носять суперечливий характер. Так, при вивченні прямої дії етанолу на Na^+, K^+ -АТФ-азу в досліді *in vitro* продемонстровано пригнічення активності цього ферменту [5-7]. Було встановлено, що чутливість Na^+, K^+ - АТФ-ази до дії етанолу *in vitro* залежить від цілісності білок-ліпідного комплексу ферменту в мембрані [8].

Дані, отримані *in vivo* при дослідженні впливу етанолу на активність Na^+, K^+ - АТФ-ази за умов різних моделей алкоголізації, носять неоднозначний та часто суперечливий характер [9,10].

В експериментах *in vivo* вперше виявлено зниження Na^+, K^+ - АТФ-азної активності на кінець першої декади ранньої постнатальної алкоголізації щурят та через 15 місяців довготривалої алкоголізації дорослих щурів. Довготривале споживання щурами 15% етанолу протягом 15 місяців призводило до помірному (на 13%) зниження Na^+, K^+ -АТФ-азної активності плазматичних мембран кори головного мозку за рахунок зниження, головним чином, убаїнчутливого компонента ферментативної активності (на 15%).

Т. Н. Замаєв разом із співавторами було встановлено, що активність Na^+, K^+ - АТФази клітин головного мозку у алкоголізованих протягом 14 діб щурів була нижчою на 24,3% у порівнянні з контролем.

З іншого боку, С. А. Сторожок із співавторами [11] показали прогресивне збільшення активності мембранозв'язаних ферментів в гомогенатах головного мозку щурів після довготривалого вживання етанолу. Через чотири тижні хронічного вживання етанолу активність Na^+, K^+ - залежної АТФази зростала на 150% .

У наших дослідженнях встановлене зростання активності Na^+, K^+ - АТФази плазматичних мембран гепатоцитів щурів, що може призвести до підвищення потреби кисню клітинами, знижуючи тим самим їх стійкість до дії додаткових патогенних факторів.

Встановлений нами вплив етанолу на функціонування цього ензиму можна пояснити, виходячи з регуляції його активності.

Відомо, що активність Na^+, K^+ - АТФ-ази в клітині регулюється багатьма факторами. На першому місці знаходяться співвідношення Na/K , яке залежить від багатьох факторів та доступність АТФ – це

фактори короточасної регуляції активності. Вміст АТФ в клітині, як правило, майже не змінюється в нормальних умовах, проте може різко знижуватись при патологічних порушеннях. С.А. Сторожок із співавторами [11] стверджують, що при вживанні алкоголю знижується рівень АТФ. В такому випадку зниження рівня АТФ буде критичним для підтримання достатньої активності Na^+ , K^+ -наосу.

Відомо, що в нативній клітині співвідношення концентрацій іонів натрію і калію протилежне тому, яке необхідне для максимальної активності Na^+ , K^+ -АТФази (оптимум активності ферменту приходить на 130 мМ Na^+ і 20 мМ K^+ при їх сумі 150 мМ, типовій для нервових клітин). У цих умовах активність ферменту складає лише 10-12%. Однак при пошкодженні клітинної мембрани, коли відбувається активація ферменту входу в клітину натрію і вихід з неї калію, відбувається активація АТФази, яка відновлює іонну асиметрію [8,12,13]. У попередніх дослідженнях нами показано, що етанол призводить до порушення структурного стану плазматичної мембрани (зміни фосфоліпідного складу та зростання процесів ПОЛ), в той час як оцтовокислий цинк її нормалізував, що може бути одним із пояснень встановлених нами змін активності цього ферменту.

Згідно досліджень ряду авторів, фосфорилування Na^+ , K^+ -АТФази протеїнкіназами зменшує її активність. Відновити свою активність після атаки протеїнкіназ Na^+ , K^+ -АТФази може за допомогою інших регуляторних ферментів – фосфатаз, які забезпечують дефосфорилування білків. Показано, що у гепатоцитах печінки при впливі етанолу знижується активність ПК С [14], що може призводити до зменшення рівня фосфорилування досліджуваного ферменту і, таким чином, бути одним із факторів зростання активності цього ферменту. Схожі зміни активності протеїнкіназ були встановлені у клітинах головного мозку, де показано, що пренатальна етанольна інтоксикація впливає на ферментативну активність в ЦНС: змінює посттрансляційну модифікацію оксидотсинтази-1 та -3, знижуючи їх активність, зменшує активність протеїнкінази С.

Цинк, навпаки, задіяний в транслокації та активації ПК С, що може бути одним із пояснень встановлених нами змін активності ферменту при введенні оцтовокислого цинку [15].

Активність Na^+ , K^+ -АТФази можуть інгібувати пептидні інгібітори, сироватка крові, убаїн та інші серцеві глікозиди. Досліди показують, що стероїдні сполуки, які подібні убаїну, утворюються і слугують для регуляції активності Na^+ , K^+ -АТФази в організмі людини і тварин. До довготривалих механізмів регуляції активності можна віднести гормональну регуляцію синтезу Na^+ , K^+ -АТФази, що здійснюється на рівні генетичного апарату [1,16]. Відомо, що активність Na^+ , K^+ -АТФази регулюється впливом альдостерону, внаслідок чого відбувається збільшення її експресії [17].

Показано, що етанол може впливати на клубочкову зону нирок, посилюючи екскрецію іонів калію з сечею і, таким чином, підвищуючи співвідношення Na^+/K^+ в організмі [18]. Алкоголь знижує чутливість адренортикоцитів до ангіотензину II, результатом чого є різке зменшення синтезу альдостерону [17,19], що теж може лежати в основі встановленого нами зростання активності ферменту.

Окрім того, відомо, що функціонування Na^+ , K^+ - АТФази визначається її фосфоліпідним оточенням, зокрема вмістом кислих фосфоліпідів, що забезпечують формування негативного заряду на поверхні мембран, чим обумовлюють відштовхування між останніми та притягування полікатіонних білків [13, 20].

Висновки

Таким чином, встановлені нами зміни активності Na^+ , K^+ - АТФази при введенні оцтовокислого цинку при хронічній алкогольній інтоксикації можуть бути пояснені змінами фосфоліпідного складу плазматичних мембран, інтенсивності процесів ПОЛ, активності протеїнкіназ та порушеннями у гормональному статусі за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

Література

1. *Болдырев А.А.* Na^+/K^+ -АТФаза – свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журнал. – 1998. - №4. – С. 49 – 56.
2. *Scheiner-Bobis G.* The sodium pump. Its molecular properties and mechanisms of ion transport / Scheiner-Bobis G. // Eur. J. Biochem. – 2002. – V. 269. – P. 2424–2433.
3. *Jamme I., Barbey O., Trouvé P. et al.* Focal cerebral ischaemia induces a decrease in activity and a shift in ouabain affinity of Na^+/K^+ -ATPase isoforms without modifications in mRNA and protein expression // Brain Res. – 1999. – V. 20, № 819 (1-2). – P. 132–142.
4. *Капля А. А.* Структурная организация и функциональная роль изоферментов Na^+/K^+ -АТФазы / Капля А. А. – К.: Киевский университет, 1998. – 162 с.
5. *Omodeo-Sale F., Lindi C., Palestini P. et al.* Role of phosphatidylethanol in membranes. Effects on membrane fluidity, tolerance to ethanol, and activity of membrane-bound enzymes // Biochemistry. – 1991. – V. 5, № 30 (9). – P. 2477–2482.
6. *Tabakoff B., Hoffman P.L.* Biochemical pharmacology of alcohol // Psychopharmacology: The third generation of progress / Ed. by H.Y.Meltzer. – N.Y.: Raven Press, 1987. – P. 1521–1526.
7. *Guerra C.* Chronic ethanol treatment affects synaptosomal membrane-bound enzymes / Guerra C., Grisolia S. // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1983. – V. 18. – P. 45–50.

8. *Мицук Д. О.* Вплив етанолу на властивості Na^+ , K^+ -АТФази кори головного мозку щурів. - Автореферат дисертації канд. біол. наук. - К., 2004. - 20 с.
9. *Wescott J. Y.* Interaction of alcohol and protein deficiency on rat brain synaptosomal (Na^+ , K^+)-ATPase / *Wescott J. Y., Weiner H.* // *Neurochemical Research.* - 1988. - V.13, № 10. - P. 963-966.
10. *Shukla S. D., Sun G. Y., Gibson Wood W. et al.* Ethanol and lipid metabolic signaling // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* - 2001. - V. 25, № 5. - P. 33-39.
11. *Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филипович Ю.Д., Глушков В.С.* Изменения физико - химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу. - Тюмень: Изд-тво ТМГА, 2001. - 196 с.
12. *Дереча Л. М.* Алкоголь та його дія на організм: огляд літератури // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. - 2007. - Вип.6, № 788. - С. 98 - 102.
13. *Flemström G., Isenberg J. I.* Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection // *News Physiol. Sci.* - 2001. - Vol. 16. - P.23 -28.
14. *Guillem J.G., O'Brian C.A., Fitzer C.J. et al.* Studies on protein kinase C and colon carcinogenesis // *Arch. Surg.* - 1987. - V. 122, №12. - P. 1458-1475.
15. *Korichneva Dagger I., Hoyos B., Chua R. et al.* Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen // *J. Biol. Chem.* - 2002. - V. 277, № 46. - P. 44327 - 44331.
16. *Asano S., Kimura T., Ueno S. et al.* Chimeric domain analysis of the compatibility between H^+ , K^+ -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase beta-subunits for the functional expression of gastric H^+ , K^+ -ATPase // *J. Biol. Chem.* - 1999. - V. 274, № 32. - P. 22257 - 22265.
17. *Semplicini A., Serena L., Valle R. et al.* Ouabain-inhibiting activity of aldosterone antagonists // *Steroids.* - 1995. - V. 60. - P. 110-113.
18. *М'ясоєдов В. В.* Вплив етанолу на біологічні мембрани і мембранні процеси / *М'ясоєдов В. В., Дереча Л. М.* // Матер. міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасні судово-експертні технології в кримінальному і цивільному судочинстві». - Харків: УВС, 2003. - С. 260-262.
19. *Karin M.* New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? // *Cell.* - 1998. - V. 93. - P. 487 - 490.
20. *Горчев В. Ф.* Роль биологических мембран в энтропийных процессах живых организмов / *Горчев В. Ф.* // Інформаційна та негентропійна терапія. - 1995. - № 2. - С. 4 - 9.

Стаття поступила до редакції 01.09.2009 р.;

Стаття прийнята до друку 20.11.2009 р.

Харченко О. І. - провідний інженер НДЛ «Фізико-хімічної біології» (Київський національний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра біохімії).

Богун Л. І. - кандидат біологічних наук, науковий співробітник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра біохімії, НДЛ «Фізико-хімічної біології».

Чайка О. В. - кандидат біологічних наук, асистент кафедри біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Сторожук В. В. - студент Київського національного університету імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра біохімії.

Долішняк О. І. - кандидат біологічних наук, доцент Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Коломийський інститут.

Рецензенти: Остапченко Л.І. - доктор біологічних наук, професор, зав. кафедри біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.