

О. М. Філінська, В. П. Лозовий, С. В. Яблонська, Г. В. Островська,
Т. В. Рибальченко, В. О. Зеленюк, В. К. Рибальченко

Вплив піридину на активність мембранозв'язаних ферментів клітин печінки

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костериним)

Pyridine does not provoke significant changes of the ecto-ATPase and 5'-nucleotidase activities of the plasma membrane of hepatocytes. Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase activity is not changed under the influence of pyridine too. Pyridine produces the alterations of the Na^{+} , K^{+} -ATPase activity that have biphasic character. A decrease of the enzyme activity is observed at nanomolar and 10^{-5} M concentrations and disappears at micromolar concentrations. This effect might be caused by features of the pyridine interaction with the membrane lipid matrix.

Діючою основою широкого класу біологічно активних речовин (БАР) різноманітного спектра дії, що використовуються в багатьох сферах людської діяльності, є піридинове ядро. Біологічно активними є такі речовини, як нікотинамід (вітамін РР), вітаміни групи В₆ (піридоксин, піридоксаль, піридоксамін), лікарські препарати (донорміл, нікодин, кордіамін, ізоніазид, 3-оксипіридин, 1,4-дигідропіридин, імідазопіридин) та пестициди (анабазин, лонтрел, піклорам) [1]. Крім того, піридин є компонентом тютюну і тютюнового диму [2]. Центральним органом метаболізму речовин, в якому здійснюються процеси біологічної трансформації ендо- та екзогенних похідних піридину, є печінка, при цьому вона першою зазнає їх шкідливого впливу. Насамперед, такий вплив відображається на функціональному стані плазматичної мембрани (ПМ) гепатоцитів. На сьогодні вплив піридину, як попередника широкого спектра БАР з різною активністю, на біологічні мембрани вивчений недостатньо.

Одним із чутливих показників впливу БАР на ПМ клітини є зміна активності мембранозв'язаних ферментів, таких як Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФаза (КФ 3.6.1.38) та Na^{+} , K^{+} -АТФаза (КФ 3.6.1.37), що регулюють іонний гомеостаз у клітині [3]. Порушення їх роботи призводить до змін внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , Na^{+} й K^{+} , що може спричинити низку метаболічних змін у клітині. Безпосереднього впливу БАР зазнають також мембранні *екто*-ферменти, активні центри яких орієнтовані в позаклітинне середовище, зокрема *екто*-АТФаза (КФ 3.6.1.3) та 5'-нуклеотидаза (КФ 3.6.1.5). Порушення активності цих ферментів під впливом БАР, у свою чергу, викликає дисбаланс позаклітинної регуляції.

Метою роботи авторів даного повідомлення було дослідити вплив піридину на активність мембранозв'язаних ферментів (Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФаза, Na^{+} , K^{+} -АТФаза, 5'-нуклеотидаза, *екто*-АТФаза) ПМ гепатоцитів щурів.

Експерименти проведені на 27 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г. ПМ гепатоцитів печінки щурів виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [4]. Вміст білка в отриманій фракції визначали методом Лоурі [5]. Для визначення 5'-нуклеотидазної активності вміст ПМ у реакційній суміші становив 20 мкг на 0,5 мл середовища інкубації такого складу: 1 ммоль/л $MgCl_2$, 4 ммоль/л АМФ, 50 ммоль/л

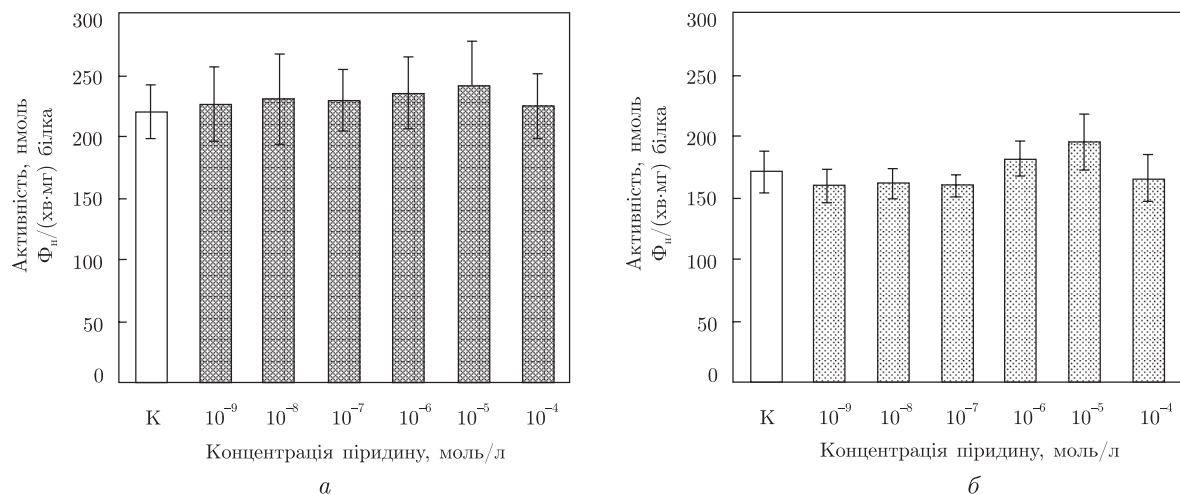


Рис. 1. 5'-Нуклеотидазна (а) та *екто*-АТФазна (б) активності ПМ гепатоцитів щурів при дії піридину в діапазоні концентрацій 10^{-9} – 10^{-4} моль/л.

Тут і на рис. 2: К — контроль-активність ферменту в фракції ПМ у відсутності піридину

трис-HCl, pH 7,5 [6]. *Екто*-АТФазну активність ПМ гепатоцитів [7] розраховували за різницею між АТФазною активністю у середовищі, яке містить іони Ca^{2+} (2 ммоль/л CaCl_2) і без них. Вміст ПМ у реакційній суміші становив 20 мкг білка на 0,5 мл середовища інкубації такого складу: 140 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 100 мкмоль/л NH_4VO_3 , 50 ммоль/л *трис*-HCl, 1 ммоль/л АТФ, pH 7,5. Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазну активність ПМ гепатоцитів [8] визначали у середовищі загальним об'ємом 0,5 мл: 100 ммоль/л KCl, 3 ммоль/л MgCl_2 , 0,06 ммоль/л ЕГТА, 50 ммоль/л *трис*-HCl, 3 ммоль/л АТФ, pH 7,5, що містить фракцію ПМ у кількості 20 мкг за білком. Фермент активували додаванням 0,04 ммоль/л CaCl_2 . Na^+ , K^+ -АТФазну активність ПМ гепатоцитів розраховували за різницею між загальною АТФазною активністю і активністю у середовищі, яке містить її специфічний блокатор — убаїн ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). За основу взято метод Преслі [9]. Вміст мембранного препарату в реакційній суміші становив 50 мкг на 0,5 мл інкубаційного середовища такого складу: 130 ммоль/л NaCl, 20 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л MgCl_2 , 0,5 ммоль/л ЕДТА, $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л ДСН, 3 ммоль/л NaN_3 , 25 ммоль/л *трис*-HCl, 3 ммоль/л АТФ, pH 7,5. Кількість неорганічного фосфату, що виділився в процесі ферментативної реакції, визначали методом Ратбуна–Бетлах [10]. Ступінь очищення фракції ізольованих ПМ гепатоцитів від інших мембранних фракцій контролювали за активністю маркерних ферментів — 5'-нуклеотидази, глюкозо-6-фосфатази та азидочутливої-АТФази. Активність мембранозв'язаних ферментів під впливом піридину визначали у фракціях ПМ гепатоцитів, додаючи в інкубаційне середовище піридин у концентраціях від 10^{-9} до 10^{-4} моль/л. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

5'-Нуклеотидазна та *екто*-АТФазна активність інтактних ПМ становить ($219,4 \pm 21,7$) нмоль $\Phi_n / (\text{хв} \cdot \text{мг})$ білка та ($168,8 \pm 16,4$) нмоль $\Phi_n / (\text{хв} \cdot \text{мг})$ білка відповідно. Встановлено, що в досліджуваному діапазоні концентрацій піридин не викликає значних змін активності цих ферментів (рис. 1), хоча в концентрації 10^{-5} моль/л піридину спостерігається недостовірне збільшення *екто*-АТФазної активності на 15% (див. рис. 1, б) порівняно з контрольними значеннями.

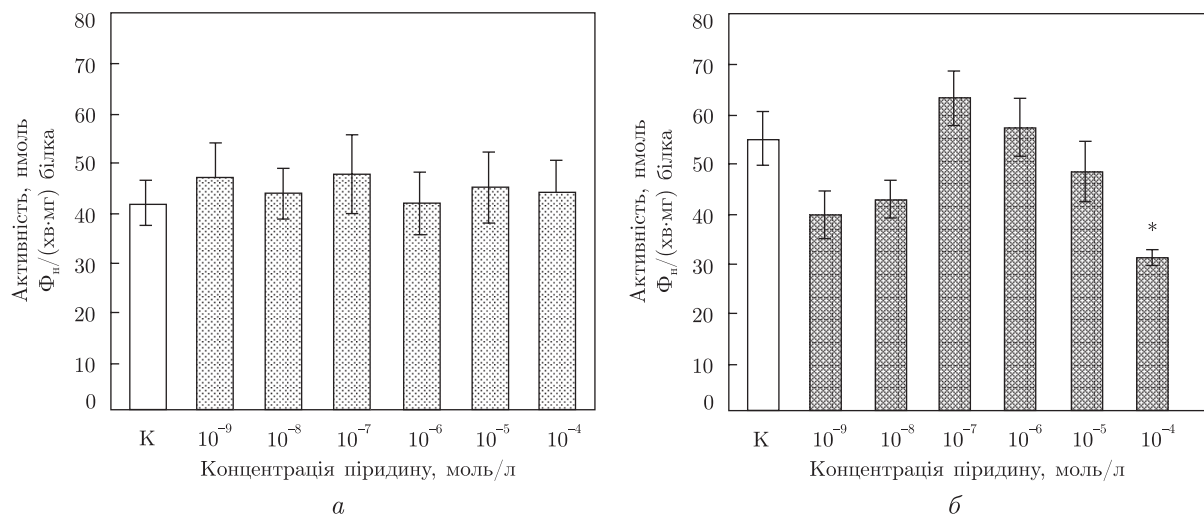


Рис. 2. Mg²⁺, Ca²⁺-АТФаза (а) та Na⁺, K⁺-АТФаза (б) активності ПМ гепатоцитів щурів при дії піридину в діапазоні концентрацій 10⁻⁹ – 10⁻⁴ моль/л
Зірочка (*) – $p < 0,05$ відносно контролю

Mg²⁺, Ca²⁺-АТФаза активність ПМ клітин печінки, яка в контролі становить (41,8 ± ± 4,5) нмоль Φ_n / (хв · мг) білка, не змінюється під впливом піридину в широкому діапазоні концентрацій від 10⁻⁹ до 10⁻⁴ моль/л (рис. 2, а). При дії піридину відбуваються різнонаправлені зміни Na⁺, K⁺-АТФазної активності (рис. 2, б), яка в контролі становить (55,7 ± 5,6) нмоль Φ_n / (хв · мг) білка. Залежність доза — ефект у досліджуваному діапазоні (10⁻⁹–10⁻⁴ моль/л) має двофазний характер. Так, у концентраціях піридину 10⁻⁹ та 10⁻⁸ моль/л Na⁺, K⁺-АТФаза активність знижується в середньому на 30%. При внесенні в інкубаційне середовище 10⁻⁷ моль/л піридину, ферментативна активність вже перевищує контрольні значення на 14%. Концентрації піридину від 10⁻⁶ до 10⁻⁴ моль/л спричинюють поступове зниження Na⁺, K⁺-АТФазної активності, порівняно з впливом його попередньої дози, викликаючи дворазове пригнічення активності при максимальній досліджуваній концентрації піридину 10⁻⁴ моль/л ($p < 0,05$).

Зареєстроване нами явище параболічної залежності Na⁺, K⁺-АТФазної активності від концентрації певної речовини є частковим проявом ефекту “парадоксальної токсичності” препарату або гормезису [11], при якому нижчі концентрації агента виявляють більш інтенсивний вплив (пригнічення активності ферменту), ніж мікромолярні. Така залежність доза — ефект спостерігається при дослідженні різноманітних БАР: регуляторів росту рослин, пестицидів [12], протипухлинних препаратів, нейропептидів, гормонів, імуномодуляторів, антиоксидантів тощо [11], має місце при дії речовин на біологічні системи різних рівнів організації (субклітинний, клітинний, органний). Механізм такої залежності є мало дослідженим, але значною мірою пов’язаний з молекулярними особливостями рецепторних систем та інших структур мембрани клітини [11], а також з різними мембранотропними ефектами БАР при їх різних концентраціях [3, 12].

Зміна ліпідного складу біологічних мембран розглядається як один з важливих молекулярних механізмів порушення їх специфічних властивостей. Так, чутливість мембраноз’язаних АТФаз до будь-яких хімічних агентів, зокрема до піридину, може визначатися тісним структурно-функціональним зв’язком між цими ферментами та ліпідним матриксом

мембрани — первинною мішенню для дії речовин різної природи [13]. Піридин не викликає значних порушень у структурі мембрани при взаємодії з нею [1], зважаючи на малі розміри молекули піридину, а також на той факт, що він не є донором водневих зв'язків. Піридин та його похідні, в тому числі й лікарські препарати, які синтезовані на його основі, мають дуже низьку мембранолітичну активність. Так, амфифільні молекули піридину лише адсорбуються на поверхні ліпосом, які сформовані з димеристоїлфосфатидилхоліну в ділянці між холіновим і гліцериновим залишками, спричиняючи цим невеликі пертурбації фосфоліпідних головок мембранної поверхні ліпосом [14]. Це сприяє проникненню води через невеликі ділянки на поверхні ліпосом, що, зумовлює неістотні порушення в упаковці фосфоліпідів [14]. Проте незначна кількість молекул піридину все таки проникає в гідрофобну зону мембрани [14], але це не викликає істотних порушень в упаковці та динаміці фосфоліпідів.

Молекула Na^+, K^+ -АТФази — це поліпептидний трансмембранний ланцюг, що кілька разів перетинає мембрану і має позамембранні петлі, що містять заряджені амінокислотні залишки. Активність ферменту значно залежить від зарядів гідрофільних головок оточуючих ліпідів [13]. Дослідження проводились на фракції ПМ, що містить правильно та неправильно орієнтовані везикули, з додаванням додецилсульфату натрію (ДСН), який сприяє утворенню пор у мембрані та проникненню компонентів інкубаційного середовища і досліджуваної сполуки всередину мембранних везикул. Тому молекули піридину можуть адсорбуватись як на зовнішній, так і на внутрішній поверхні мембрани гепатоцитів в області полярних головок ліпідів і безпосередньо впливати на молекулу ферменту. Відмінність у характері відповіді Na^+, K^+ -АТФази та $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФази на вплив піридину зумовлена, можливо, відмінностями в їх структурі. Зокрема, при схожій амінокислотній послідовності цих ферментів у молекулі Na^+, K^+ -АТФази, крім α -субодиниці, є ще один малий поліпептидний ланцюг, що формує β -субодиницю [13] і регулює активність ферменту. Причиною більш виражених змін Na^+, K^+ -АТФазної активності при порівнянні з $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазною може бути вплив піридину на β -субодиницю.

Таким чином, піридин практично не змінює активність як мембранних ектоферментів — 5'-нуклеотидази, *екто*-АТФази, так і $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФази. Na^+, K^+ -АТФазна активність ПМ під впливом піридину *in vitro* проявляє двофазовий характер залежності доза — ефект з двома мінімумами, що є наслідком різних ефектів піридину на матрикс мембрани при різних концентраціях цієї сполуки і може спричинити порушення іонного гомеостазу натрію і калію в клітині при певних концентраціях піридину.

1. *Медведев В. А.* Мембранолітична активність і молекулярна структура ароматичних сполук // Доп. АН УРСР. Сер. Б. — 1986. — № 11. — С. 80–82.
2. *Ji L., Melkonian G., Riveles K. et al.* Identification of Pyridine Compounds in Cigarette Smoke Solution That Inhibit Growth of the Chick Chorioallantoic Membrane // *Toxicol. sciences.* — 2002. — **69**. — P. 217–225.
3. *Рыбальченко В. К., Островская Г. В.* Мембранотропная активность нейрогипофизарных гормонов. — Луганск: Елтон-2, 1998. — 84 с.
4. *Song C. S., Rubin W., Rifkind A. B. et al.* Plasma membranes of the rat liver isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi // *J. Cell Biol.* — 1969. — **41**, No 1. — P. 124–131.
5. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — **193**, No 1. — P. 265–275.
6. *Matlied M. A., Crankshaw J., Lenfield R. S. et al.* Characterization of membrane fractions and isolation purified plasma membrane from myometrium // *Ibid.* — 1974. — **254**, No 6. — P. 1834–1840.
7. *Heine P., Braun N., Heilbronn H, et al.* Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP-diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells // *Eur. J. Biochem.* — 1999. — **262**. — P. 102–107.

8. Emmelot P., Bos J. Mg^{2+} -ATPase, $(Na^+ - K^+ - Mg^{2+})$ -ATPase and 5'-nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver // *Biol. Biochem. Acta.* – 1966. – **120**. – P. 369–382.
9. Pressley T. A., Haber R. S., Loeb J. N. et al. Stimulation of Na^+ , K^+ -activated adenosine triphosphatase and active transport by low external K^+ in a rat liver cell line // *J. Gen. Phys.* – 1986. – **87**, No 4. – P. 591–606.
10. Rathbun W. B., Betlach M. V. Estimation of enzymatically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate // *Annal. Biochem.* – 1969. – **28**. – P. 436.
11. Cook R., Calabrese E. The importance of hormesis to public health // *Environ. health perspect.* – 2006. – **114**, No 11. – P. 1631–1635.
12. Ostrowska G., Yablonska S., Rybalchenko T. et al. The influence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on the hepatocyte plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in vivo and in vitro // *Annal. Univ. M. Curie-Sklodowska. Sec. DDD. Pharm., Poland.* – 2004. – **17**, No 2. – P. 331–333.
13. Scheiner-Bobis G. The sodium pump: Its molecular properties and mechanics of ion transport // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – **269**. – 2424–2433.
14. Henderson J. M., Iannucci R. M., Petersheim M. G. An NMR study of pyridine associated with DMPC liposomes and magnetically ordered DMPC-surfactant mixed micelles // *Biophys. J.* – 1994. – **67**. – P. 238–249.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 15.11.2007

УДК 577.125.8

© 2008

Член-кореспондент НАН України В. П. Черних, А. Л. Загайко,
Л. М. Вороніна, К. В. Стрельченко

Вікові особливості обміну ліпідів і ліпопротеїнів у сироватці крові сирійських хом'ячків-самців у нормі та при застосуванні висококалорійної дієти

Some parameters of lipid and lipoprotein metabolism in blood serum and liver of 4 and 20 weeks aged male hamsters in the norm and under high-caloric diet are investigated. It has been shown that the lipid profile of a blood plasma is degraded with aging in males, that expresses in an increase of the contents of FFA and triglycerides and a decrease of the HDL-cholesterol level. Under the use of a high-caloric diet, atherogenic dyslipidemia, which expresses in an increase of the levels of hypertriacylglycerolemia and apo-B-lipoproteins and a decrease of the HDL-cholesterol level, develops in experimental animals irrespective of age.

Незбалансоване висококалорійне харчування може бути причиною виникнення ряду патологічних станів, у тому числі метаболічного синдрому [1]. Метаболічний синдром — це комплекс гормональних та метаболічних порушень, які мають виражений проатерогенний характер. Однією з важливих складових цієї патології є порушення обміну ліпідів та ліпопротеїнів. Для дисліпідемії, яка формується за умов метаболічного синдрому, характерно зростання вмісту в крові триацилгліцеролів, зниження рівня холестеролу у складі ліпопротеїнів високої густини (ХС ЛВГ) та накопичення ліпопротеїнів низької густини (ЛНГ), які мають високий ступінь атерогенності (ЛНГВ) [2].