

ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ ВІТАМІНІВ ГРУПИ В НА АКТИВНІСТЬ Na^+ -, K^+ -АТФази У ТКАНИНАХ ЩУРІВ

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
Одеський державний медичний університет

Вступ

Відомо, що вітаміни групи В беруть участь в енергетичних процесах тварин і людини. Велику роль у них відіграє і Na^+ -, K^+ -АТФаза. І хоча структура, механізми регуляції та клітинні функції Na^+ -, K^+ -АТФази описані в багатьох оглядах [1; 2], у жодному з них немає посилення на роботи, в яких вивчався б вплив вітамінів групи В на її активність. Проте, на нашу думку, між ними має бути досить тісний зв'язок. Так, нами раніше були отримані дані про те, що вітаміни групи В впливають на активність Na^+ -, K^+ -АТФази в органах тварин і від цього ферменту певною мірою залежить їх транспорт через біомембрану та їх всмоктування [3]. Однак досі достеменно невідомо, який саме механізм змінює активність ферменту під дією вітамінів або їх комплексу.

Метою роботи стало дослідження зміни активності препаратів Na^+ -, K^+ -АТФази із сірої речовини кори мозку (переважно α 2-, α 3/ β 1-ізоформи) і зовнішніх медул нирок (α 1/ β 1-ізоформа) щурів при введенні їм комплексу вітамінів групи В.

Матеріали та методи дослідження

В експерименті використовували 16 щурів лінії Wistar, масою $(160,0 \pm 5,0)$ г. Щурів було поділено на дві групи. Тваринам першої групи (контрольної) вводили внутрішньом'язово фізіологічний розчин, другої (до-

слідної) — вітамінний комплекс (ВК) такого складу (у міліграмах на кілограм маси тварин): тіаміну (B_1) — 6 мг/кг, флавінмононуклеотиду (ФМН) — 2 мг/кг, пантотенової кислоти (B_3) — 25 мг/кг, піридоксину (B_6) — 5 мг/кг, нікотинаміду (НА) — 20 мг/кг і ліпоєвої кислоти (ЛК) — 2 мг/кг. Тварин брали у дослід через 2 год після введення фізіологічного розчину та комплексу вітамінів, оскільки основна їх частина вже встигає перетворитись у коферментні форми.

Мікросоми сірої речовини мозку щурів отримували за методом Свіднер [4]. Мікросоми зовнішніх медул нирок щурів і виділення Na^+ -, K^+ -АТФази з усіх видів тканин проводили за методом Йоргенсена [5].

Електрофоретичне розділення білків проводили за методом Вебера — Осборн [6] у градієнтному (4–15 %) SDS-PAAG (Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel), використовуючи 0,1 М Na -фосфатний буфер (рН 7,2), який містить 0,1 % SDS, при 15 °С. Гель забарвлений Ку-масі G-250.

Активність Na^+ -, K^+ -АТФази визначали в інкубаційному середовищі (рН 7,4) такого складу: імідазолу — 30 мМ, NaCl — 130 мМ, KCl — 20 мМ, MgCl_2 , Na_2ATP — 3 мМ. Na^+ -, K^+ -АТФазну активність (уабайнчутливу) розраховували за різницею між активностями загальної та Mg^{2+} -АТФази. Активність Mg^{2+} -АТФази визначали у середовищі 1 мМ уабайну. Мірою активності був приріст концентрації неорганічного фосфату

[7]. Визначення білка проводили за методом Лоурі [8]. Активність АТФази виражали у мікромолях фосфату неорганічного на міліграм білка за 1 год ($\text{мкмоль}\Phi_{\text{H}}/\text{мг год}$).

Результати оцінювали за загальноприйнятим t-критерієм Стьюдента [9].

Результати дослідження та їх обговорення

Ідентифікацію та чистоту отриманих препаратів Na^+ -, K^+ -АТФази визначали методом електрофорезу. Згідно з отриманими результатами (рисунок), нами дійсно виділені й очищені препарати цього ферменту, точніше відповідних комплексів з узятих у дослід тканин щурів.

Результати виділення ферменту з органів тварин були

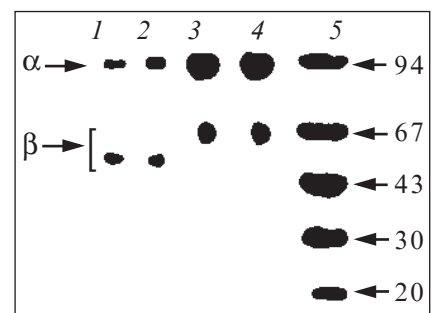


Рисунок. Електрофореграма препаратів Na^+ -, K^+ -АТФази сірої речовини мозку (1, 2) та зовнішніх медул нирок (3, 4) щурів; (5) — стандартна білкова суміш, (1, 3) — препарати контрольної групи, (2, 4) — препарати дослідної групи. Праворуч показано положення білків-маркерів, ліворуч — положення α - та β -субодиниць Na^+ -, K^+ -АТФази

такими. Як вказувалося вище, органи (мозок і нирки) з кожної з двох груп тварин (по 8) об'єднувалися. Їх наважки були при цьому однаковими для груп, і виділення ферменту проводили одночасно і в однакових умовах. Проте загальна кількість виділеного ферменту була дещо вищою у тварин, яким вводили полівітамінний комплекс (табл. 1).

При цьому для нирок приріст становив 31,6 %, а для мозку — 28,8 %, тобто майже в однаковій мірі. До того ж зазначимо, що з мозку його виділено більше майже у 4 рази, ніж із нирок. Це, на наш погляд, пояснюється тим, що мозок складається із збудливих тканин, де роль цього ферменту є особливо визначною.

Що стосується ступеня очистки, то його можна досить просто вирахувати із даних, наведених у табл. 2. Для цього потрібно розділити питому активність очищеного препарату на активність у гомогенаті. Отримані дані (див. табл. 2) свідчать про таке. По-перше, ступінь очистки з обох органів досить високий і мало відрізняється. По-друге, ін'єкції ВК на цей показник практично не вплинули, тобто не змінився ні фізіологічний, ні біохімічний стан тканин.

Аналіз даних, наведених у табл. 3, показує, що у нормі (контроль) питома активність Na^{+} -, K^{+} -АТФази у нирках набагато вища, ніж у мозку, причому майже однаковою мірою як для гомогенатів, так і очищених препаратів — у 3,4 та 3,8 разу відповідно. Після ін'єкцій ВК ця закономірність виражена менше: 2,15 та 2,17 разу. Отже, ВК більшою мірою активує АТФазу мозку, ніж нирок. Це простежується як у гомогенатах, де активація становить для мозку 2,0 рази, а для нирок — 1,29 рази, так і для очищених препаратів — 1,98 та 1,15 разу відповідно. При цьому вказана активація виразна і вірогідна.

Таблиця 1
Загальна кількість ферменту (мг білка), виділеного з органів двох груп тварин, n=8

Органи	Контроль	ВК
Мозок	22,20	28,60
Нирки	5,88	7,74

Таблиця 2
Ступінь очищення Na^{+} -, K^{+} -АТФази з органів двох груп тварин (співвідношення активностей гомогенат/препарат)

Органи	Контроль	ВК
Мозок	973	952
Нирки	1083	959

Таблиця 3
Активність Na^{+} -, K^{+} -АТФази в гомогенатах і очищених ферментних препаратах із мозку та нирок щурів через 2 год після введення комплексу вітамінів, мкмоль Φ_{H} /мг за 1 год, n=5

Органи	Гомогенати органів		Очищений препарат Na , K -АТФази	
	Контроль	ВК	Контроль	ВК
Мозок	0,063±0,005	0,127±0,008*	61,328±5,720	121,021±15,280*
Нирки	0,213±0,018	0,274±0,021*	230,750±18,310	263,323±24,350

Примітка. У табл. 3, 4: * — різниця з контролем вірогідна ($P < 0,05$).

Проте деякий інтерес викликає і величина всієї (повної) активності цього ферменту, виділеного з органів тварин, тобто з урахуванням даних табл. 1, де наведена кількість його у міліграмах білка. Перемноження питомих активностей очищеного ферменту (див. табл. 3) на вміст ферментного білка (див. табл. 1) дає такі значення (табл. 4), з яких видно, що повна активність цього (виділеного) ферменту в органах контрольних тварин майже однакова. Ін'єкції ВК її підвищують ще більш суттєво і виразно, ніж питому активність (див. табл. 3). Із цього випливає, що після ін'єкції ВК зростає не тільки кількість самого ферменту в тканинах, але і його активність, тобто спостерігаються збільшення кількості ферменту (можливо, внаслідок індукції) й активація вже наявних його молекулярних комплексів. Визначення співвідношення ролі та механізмів цих процесів буде метою наших подальших досліджень.

Висновки

1. Виділена й очищена Na^{+} -, K^{+} -АТФаза із сірої речовини мозку та зовнішніх медул нирок

Таблиця 4
Повна активність виділених ферментних препаратів із мозку та нирок контрольних і дослідних тварин, мкмоль Φ_{H} /на весь білок за 1 год, n=5

Органи	Контроль	ВК
Мозок	1361,5± ±91,0*	3460,6± ±317,0*
Нирки	1356,6± ±122,0*	2038,1± ±196,0*

щурів. Ступінь очистки становить близько 1000 разів.

2. Активність ферменту суттєво зростає після введення ВК як в гомогенатах, так і очищених препаратах Na^{+} -, K^{+} -АТФази.

3. Ін'єкції ВК збільшували як питому (на міліграм білка), так і ще більшою мірою загальну (на всю фракцію) активність Na^{+} -, K^{+} -АТФази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А. Na/K -АТФаза как олигомерный ансамбль / А. А. Болдырев // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 8. — С. 1013-1025.

2. Лопина О. Д. Взаимодействие каталитической субъединицы Na/K -АТФази с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами

/ О. Д. Лопина // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 10. — С. 1389-1400.

3. Карпов Л. М. Реалізація специфічної активності функціонально зв'язаних вітамінів групи В, їх похідних і комплексів за різних станів організму: дис. ... доктора біол. наук: 14.00.25 / Карпов Леонід Михайлович. — Одеса, 1994. — 505 с.

4. Sweadner K. J. Preparation of the $\alpha(+)$ isozyme of the Na/K-ATPase from mammalian axolemma / K. J. Sweadner // *Methods in Enzymology*. — 1988. — Vol. 156. — P. 65-71.

5. Jorgensen P. L. Purification of Na/K-ATPase: enzyme sources, preparative problems, and preparation from mammalian kidney / P. L. Jorgensen // *Methods in Enzymology*. — 1988. — Vol. 156. — P. 29-43.

6. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber, M. Osborn // *J. Biol. Chem.* — 1969. — Vol. 244. — P. 4406-4412.

7. Rathbun W. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the

presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // *Anal. Biochem.* — 1969. — Vol. 28. — P. 436-447.

8. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

9. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю. Данилова. — М.: Практика, 1999. — 459 с.

УДК 577.152.3:122.5

Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов

ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ ВІТАМІНІВ ГРУПИ В НА АКТИВНІСТЬ Na^+ -, K^+ -АТФази У ТКАНИНАХ ЩУРІВ

Досліджували активність виділеної і очищеної Na^+ -, K^+ -АТФази сірої речовини кори мозку та зовнішніх медул нирок щурів після введення комплексу вітамінів групи В. Встановили, що це призводить до збільшення активності Na^+ -, K^+ -АТФази сірої речовини мозку та зовнішніх медул нирок щурів. При цьому зростає питома активність (на міліграм білка), і ще більшою мірою — загальна активність ферменту (на всю кількість).

Ключові слова: Na^+ -, K^+ -АТФаза, активність, комплекс вітамінів групи В.

UDC 577.152.3:122.5

L. M. Karpov, V. Yu. Anisimov

THE GROUP B VITAMINS COMPLEX INFLUENCE ON Na^+ -, K^+ -ATPase ACTIVITY IN THE RATS TISSUES

It was investigated the group B vitamins complex effect on activity of the extracted and cleared Na^+ -, K^+ -ATPase from the grey matter of rats brain and the outer medulla of rats kidney. It was identified that it leads to increase of Na^+ -, K^+ -ATPase activity from the grey matter of rats brain and outer medulla of rats kidney. The specific (on mg of protein) and to a greater extent common (on all amount) activity of enzyme increase.

Key words: Na^+ -, K^+ -ATPase, activity, the group B vitamins complex.

УДК 615.212:615.276:547.857.4

І. В. Кіреєв

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНАЛГЕТИЧНОЇ ТА АНТИЕКСУДАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЗАМІЩЕНИХ 7-АЛКІЛ-8-ППЕРАЗИНО-3-МЕТИЛКСАНТИНІВ

Національний фармацевтичний університет, Харків

Біль при ревматичних захворюваннях має запальну природу, а механізм розвитку болю визначається подразненням нервових закінчень (ноцицепторів) медіаторами, які вивільнюються при ушкодженні тканин (запалення, травма, ішемія та ін.) або при патологічних порушеннях у нервовій системі. У живому організмі ендogenous медіатори мають здатність стимулювати ноцицептори аферентних волокон, а інші збільшують чутливість їх до подразника [2].

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) застосовують для зменшення больового

синдрому [3; 4]. Вони пригнічують синтез медіаторів болю і запалення, тому є основною фармакологічною групою, яку застосовують для лікування ревматоїдного артрити. Протизапальний і анальгетичний ефект НПЗП пов'язаний із пригніченням циклооксигенази (ЦОГ-1), що призводить до порушення синтезу простагландинів класу E та розвитку у слизовій оболонці шлунка патологічних процесів [5; 6]. Також НПЗП пригнічують активність циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) в осередку запалення — ключового ферменту синтезу простагландинів

прозапальної реакції [7]. Прийом НПЗП може призводити до розвитку побічних ефектів із боку шлунково-кишкового тракту та деяких інших органів [8].

Імовірність розвитку ерозивно-виразкового ураження при терапії НПЗП залежить від вихідного стану слизової оболонки шлунка, а також від інтенсивності та тривалості терапії. При наявному ерозивно-виразковому процесі у гастродуоденальній зоні продовження терапії НПЗП сприяє прогресуванню виразкового процесу, розвитку кровотечі та перфорації [9].