

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 577.152.3

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К УБАИНУ Na^+, K^+ -АТФ-азы МИКРОСОМНЫХ МЕМБРАН ГЛАДКИХ МЫШЦ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ КРЫСЫ

А. А. КАПЛЯ

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua

Для выявления активности отдельных молекулярных форм энзима, различающихся по сродству к сердечным гликозидам, проведен анализ концентрационной зависимости ингибирования убаином Na^+, K^+ -АТФ-азной активности пермеабилizированных микросом гладких мышц ободочной кишки крысы согласно модели для двух независимых центров связывания ингибитора. Выявлен двухфазный характер ингибирования с умеренным содержанием активности высокоаффинного к убаину компонента. Кажущаяся константа ингибирования превалирующего компонента низкого сродства к ингибитору соответствует величине для Na^+, K^+ -АТФ-азы микросом почек крысы ($\alpha 1$ -изоформа). Обсуждается предполагаемая специфика роли $\alpha 2$ - и $\alpha 1$ -изоформ каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы в обеспечении электромеханического сопряжения гладких мышц ободочной кишки.

Ключевые слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза, изоформы, убаин, гладкие мышцы, ободочная кишка.

Известно, что существование изоформ субъединиц Na^+, K^+ -АТФ-азы ($\alpha 1$ – $\alpha 4$, $\beta 1$ – $\beta 3$), собранных в функционально различающиеся $\alpha\beta$ -гетеродимерные изоэнзимные комплексы, обеспечивает ткане- и видоспецифичный механизм регуляции ионного транспорта Na^+ и K^+ . Изоформы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы обладают уникальными энзимными и регуляторными свойствами, изоформы гликозилированной β -субъединицы оказывают модулирующий эффект и участвуют в межклеточном распознавании. Конститутивным изоэнзимом является $\alpha 1\beta 1$ -комплекс, в то время как другие изоформы обеспечивают специализированные функции клеток [1–4].

Na^+, K^+ -АТФ-аза является фармакологической мишенью сердечных гликозидов, а α -субъединица – их главным рецептором. Видовая гетерогенность сродства к этим кардиоактивным стероидам проявляется присутствием у грызунов (в частности крыс) уникального низкоаффинного к убаину фенотипа $\alpha 1$ -изоформы, что позволяет дифференцировать активность изоформ по чувствительности к ингибитору [5].

В гладких мышцах ободочной кишки собаки [6], легочной артерии телят [7], матки

крысы и человека [8, 9], кровеносных сосудов мышцы [10] идентифицирована $\alpha 2$ -изоформа Na^+, K^+ -АТФ-азы. Она характеризуется особенностями каталитических свойств и катионного сродства, обладает большей чувствительностью к окислению и ингибированию Ca^{2+} . Кроме того, $\alpha 2$ -изоформа является специфичной мишенью гормональной регуляции (инсулином, тиреоидными гормонами) и эндогенными дигиталис-подобными веществами, выполняет специфическую функцию в электромеханическом сопряжении гладких мышц [1–3, 10, 11]. Для изучения специфики функциональных эффектов необходимо дифференциальное определение функциональной активности изоформ Na^+, K^+ -АТФ-азы в гетерогенных по изоэнзимному составу препаратах, что в гладких мышцах зачастую представляет трудность даже в случае суммарной энзимной активности [6].

Цель настоящих исследований – проанализировать концентрационную зависимость ингибирования убаином Na^+, K^+ -АТФ-азной активности пермеабилizированных микросом гладких мышц ободочной кишки крыс для выявления отдельных молекулярных форм энзима и оценить относительное содержание их активности в препаратах. Впервые установ-

лено, что ингибирование убаином микросомной Na^+, K^+ -АТФ-азы гладких мышц ободочной кишки крыс имеет двухфазный характер концентрационной зависимости с умеренным содержанием высокоаффинного к убаину компонента активности.

Материалы и методы

Микросомную фракцию получали из мозгового вещества почек [12] и из гладкой мышцы ободочной кишки крыс [13] с некоторыми особенностями. После продольного разрезания сегментов ободочной кишки и удаления химуса фрагменты промывали в физиологическом растворе на трис/ЭДТА буфере и соскабливанием очищали мышечный слой от слизистой оболочки. Мышцы измельчали ножницами и гомогенизировали на ножевом гомогенизаторе, фильтровали через несколько слоев марли. Среда гомогенизации содержала 20 мМ трис-НСI (рН 7,4 при 20 °С), 0,32 М сахарозу, 2 мМ ЭДТА, ингибиторы протеиназ (1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 50 мкг/мл бензамидина натрия, 0,1 мг/мл соевого ингибитора трипсина).

После предобработки мембран дигитонином (протеин/детергент 1 : 1) АТФ-азную активность определяли в стандартной среде (0,5 мл) [13], содержащей, помимо 1 мМ ЭГТА, дополнительно 5 мМ азид натрия и 1 мМ диотреитол. Остаточная концентрация детергента не превышала 0,004%. Na^+, K^+ -АТФ-азная активность микросомных препаратов составляла 50–60 и 15–17 мкмоль P_i /час на 1 мг протеина для почек и гладких мышц ободочной кишки крыс, соответственно.

Концентрационную зависимость ингибирования Na^+, K^+ -АТФ-азы убаином изучали в соответствии с описанными ранее условиями [13]. Максимальная ингибирующая концентрация убаина составляла 3 мМ. Параметры ингибирования убаином Na^+, K^+ -АТФ-азной активности отдельных рецепторных форм энзима в гетерогенных по изоэнзимному составу препаратах рассчитывали согласно модели для двух независимых центров связывания гликозида, используя следующее уравнение [5, 14]:

$$V_{\Sigma} = \frac{K_{i,1} \cdot V_{max,1}}{K_{i,1} + [i]} + \frac{K_{i,2} \cdot V_{max,2}}{K_{i,2} + [i]},$$

где K_i – кажущаяся константа ингибирования, $[i]$ – концентрация ингибитора, V_{max} – максимальная активность компонентов высокого (1) и низкого (2) сродства к убаину (выражена в

относительных величинах, 100% – суммарная активность двух изоформ Na^+, K^+ -АТФ-азы V_{Σ}).

Статистический анализ и аппроксимацию кривых проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и OriginPro 7.0.

Результаты и обсуждение

Зависимость активности Na^+, K^+ -АТФ-азы от концентрации убаина в микросомальных препаратах исследуемых тканей крысы представлена на рис. 1. Для микросом почек ингибирование убаином в микромолярном диапазоне концентраций описывается однофазной кривой (рис. 1, кривая 1), которая линеаризуется в координатах $1/V = f(i)$ в соответствии с уравнением $1/V = 1/V_{max,2} + [i]/(K_{i,2} \cdot V_{max,2})$ с коэффициентом корреляции $R = 0,999$. Это хорошо согласуется с одноцентровой моделью связывания ингибитора с энзимом в соответствии с классическими представлениями о взаимодействии Na^+, K^+ -АТФ-азы с убаином [5] (см. “Материалы и методы”, уравнение при $V_{max,1} = 0$; $K_{i,2} = 70,24 \pm 7,55$ мкМ, $V_{max,2} = 99,08 \pm 0,91\%$ от суммарной активности препарата; $M \pm m$, $n = 4$). Хорошо известно, что Na^+, K^+ -АТФ-аза почек гомогенна по изоэнзимному составу каталитической субъединицы и содержит только ее конститутивную $\alpha 1$ -изоформу, и у крыс (грызунов) относится к резистентному к сердечным гликозидам видоспецифичному фенотипу энзима [5]. В противоположность энзиму почек для микросомальной Na^+, K^+ -АТФ-азы гладких мышц ободочной кишки дозозависимое ингибирование убаином осуществляется в значительно более широком диапазоне концентраций и имеет двухфазный характер с дополнительным минорным высокоаффинным компонентом в области субмикромолярных концентраций ингибитора (рис. 1, кривая 2). Кажущая константа ингибирования для преобладающего низкоаффинного компонента Na^+, K^+ -АТФ-азной активности (рис. 1, кривая 3; $K_{i,2} = 73,08 \pm 9,43$ мкМ; $M \pm m$, $n = 5$) не отличается от таковой для энзима почек. Для низкоаффинного компонента $V_{max,2} = 80,77 \pm 1,32\%$ ($n = 5$) от суммарной активности препарата. Основываясь на современных представлениях о молекулярной природе рецептора сердечных гликозидов и механизмах ингибирования [5], рассчитанная по экспериментальным данным величина $V_{max,2}$ указывает на содержание низкоаффинной к убаину $\alpha 1$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы во фракции гладкомышечных микросом крысы (рис. 1, кривая 4). Хорошее соответствие дозозависимости ингибирования

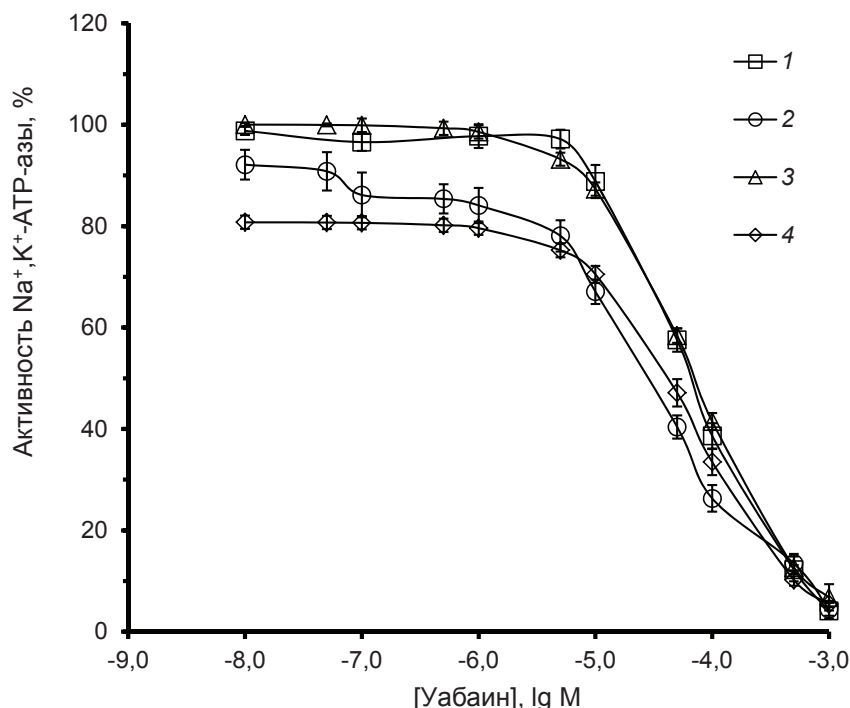


Рис. 1. Ингибирование убаином Na^+, K^+ -АТФ-азной активности в мембранных препаратах из почек (1, $n = 3-4$) и гладких мышц ободочной кишки крыс (2-4, $n = 5$). Представлены данные для экспериментальной двухфазной кривой ингибирования (2), расчетных кривых индивидуального ингибирования активности низкоаффинного к убаину компонента (3, 4) в препаратах мышц, $M \pm m$, 100% — Na^+, K^+ -АТФ-азная активность препарата (1, 2, 4) или низкоаффинного к убаину компонента (3) в отсутствие ингибитора

активности низкоаффинного к убаину компонента Na^+, K^+ -АТФ-азы гладких мышц и энзима почек наглядно продемонстрировано на рис. 1 (кривые 3 и 1).

С учетом рассчитанных параметров для $\alpha 1$ -изоформы ($K_{i,2} = 73,08$ мкМ, $V_{max,2} = 80,77\%$) аппроксимированы данные для усредненной двухфазной кривой ингибирования убаином гладкомышечной Na^+, K^+ -АТФ-азы согласно модели для двух независимых центров связывания гликозида (см. “Материалы и методы”, уравнение). Доля активности убаинчувствительного компонента составляет $V_{max,1} = V_{\Sigma} - V_{max,2} = 19,23 \pm 1,32\%$. Достаточно близкое соответствие расчетных точек с экспериментальными достигается при $K_{i,1} = 0,1$ мкМ (рис. 2, кривая 1). Характер расчетных кривых низкоаффинного и высокоаффинного к убаину компонентов (рис. 2, кривые 2 и 3, соответственно) — составляющих двухфазной кривой ингибирования гладкомышечной Na^+, K^+ -АТФ-азы, и величины кажущихся констант ингибирования индивидуальных рецепторных форм энзима находятся в полном соответствии с таковыми, рассчитанными ранее для гетеро-

генных по изоэнзимному составу мембранных препаратов мозга крысы [5].

Для ответа на вопрос о предполагаемой молекулярной природе высокоаффинной к убаину рецепторной формы следует обратиться к работе [6], в которой в кольцевой гладкой мышце ободочной кишки собаки наряду с $\alpha 1$ -изоформой выявлена экспрессия (мРНК и протеина) $\alpha 2$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы. Экспрессия $\alpha 3$ -изоформы не обнаружена. Использование пермеабелизованных мембран в наших исследованиях позволяет определить достаточно высокий уровень Na^+, K^+ -АТФ-азной активности в микросомальных препаратах в методических условиях, обеспечивающих оптимальное соотношение детергент/протеин при предобработке мембран и незначительную концентрацию дигитонина во время проведения АТФ-азной реакции. Низкая аффинность к убаину $\alpha 1$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы крыс позволяет кинетически дифференцировать активность разных изоформ каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы в гетерогенных по изоэнзимному составу препаратах.

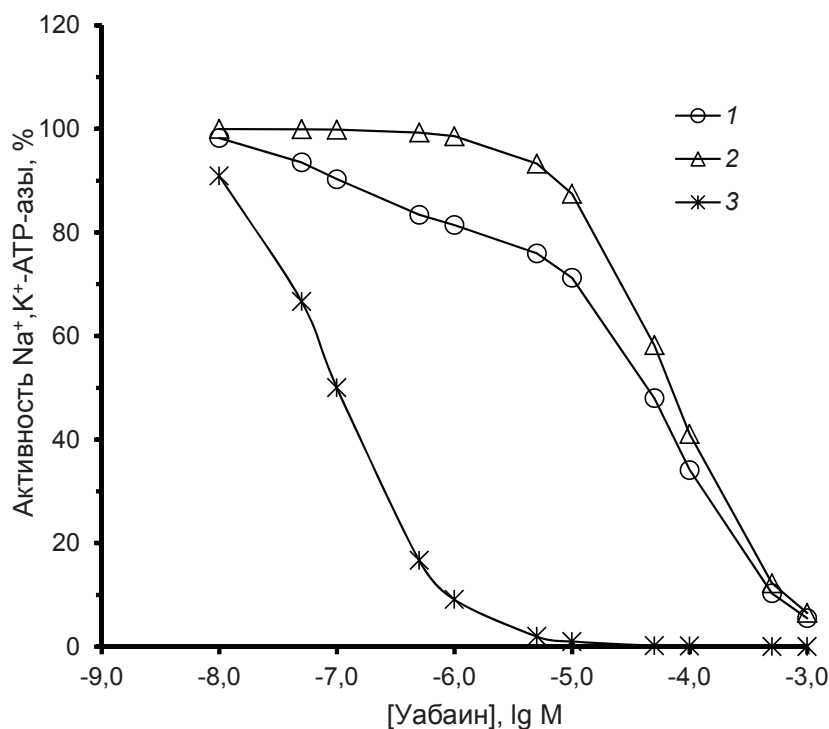


Рис. 2. Аппроксимация данных в соответствии с моделью для двух независимых центров связывания уабаина (1) для участков низкого (2) и высокого сродства (3) к уабаину. Использовали значения $K_{i,1} = 0,1 \text{ мкМ}$; $K_{i,2} = 73,08 \text{ мкМ}$; $V_{max,1} = 19,23\%$; $V_{max,2} = 80,77\%$ от суммарной энзимной активности препарата

Присутствие $\alpha 2$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы в возбудимых тканях, которая обладает особенностями локализации в плазматической мембране, ионной и гормональной регуляции, чувствительности к Ca^{2+} и уабаину [3, 11], может обеспечивать специфику физиологической регуляции электромеханической активности гладкомышечных клеток ободочной кишки и особенности патофизиологического ответа. Дополнительная $\alpha 2$ -изоформа, очевидно, тканеспецифична для сарколеммы скелетных и гладких мышц [3]. Для сарколеммы миокарда взрослых крыс также характерно значительное преобладание содержания $\alpha 1$ -изоформы над $\alpha 2$ -изоформой Na^+, K^+ -АТФ-азы [15], что соответствует представленным данным для гладких мышц ободочной кишки. Этим обеспечивается возможность регуляции сократительной активности при ингибировании $\alpha 2$ -изоформы, в частности, эндогенными дигиталис-подобными веществами, на фоне стабильности электрофизиологических процессов, обеспечиваемых гликозидрезистентной $\alpha 1$ -изоформой.

Таким образом, кинетический анализ гетерогенности чувствительности Na^+, K^+ -АТФ-азной активности к сердечному гликозиду уа-

баину в мембранных препаратах гладких мышц толстой кишки крыс указывает на наличие по крайней мере двух изоформ каталитической субъединицы энзима: преобладающей конститутивной низкоаффинной к кардиоактивным стероидам $\alpha 1$ -изоформы и дополнительной, сопутствующей, специализированной изоформы с высоким сродством к уабаину, очевидно, $\alpha 2$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы.

ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ЧУТЛИВОСТІ ДО УАБАЇНУ Na^+, K^+ -АТФ-ази МІКРОСОМНИХ МЕМБРАН ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ОБОДОВОЇ КИШКИ ЩУРА

О. А. Капля

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua

Для виявлення активності окремих молекулярних форм ензиму, що відрізняються за спорідненістю до серцевих глікозидів, проведено аналіз концентраційної залежності інгібування уабаїном Na^+, K^+ -АТФ-азної

активності пермеабілізованих мікросом гладеньких м'язів ободової кишки щура згідно з моделлю для двох незалежних центрів зв'язування інгібітора. Виявлено двофазний характер інгібування з помірним вмістом активності високоафінного до уабаїну компонента. Позірна константа інгібування компонента з низькою спорідненістю до інгібітора відповідає величині для Na^+, K^+ -АТФ-ази мікросом нирок щура ($\alpha 1$ -ізоформа). Обговорюється специфіка ролі $\alpha 2$ - та $\alpha 1$ -ізоформ каталітичної субодиниці Na^+, K^+ -АТФ-ази в забезпеченні електромеханічного спряження гладеньких м'язів ободової кишки.

Ключові слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза, ізоформи, уабаїн, гладенькі м'язи, ободова кишка.

THE HETEROGENEITY OF THE Na^+, K^+ -ATPase OUBAIN SENSITIVITY IN MICROSOMAL MEMBRANES OF RAT COLON SMOOTH MUSCLES

A. A. Kaplya

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The dose dependence of the Na^+, K^+ -ATPase ouabain inhibition in the rat colon smooth muscle permeabilized microsomes has been analyzed according to the model of two independent binding sites of inhibitor to determine the activity of separate molecular forms of the enzyme that differ by affinity for cardiac glycosides. The two-phase inhibition curve with moderate content of the high-affinity activity component was revealed. The apparent inhibition constant of the low-affinity component corresponds to the value for the rat kidney microsomal Na^+, K^+ -ATPase ($\alpha 1$ -isoform). The specific role of the $\alpha 2$ - and $\alpha 1$ - Na^+, K^+ -ATPase

catalytic subunit isoforms in colonic smooth muscle electromechanical coupling is considered.

Key words: Na^+, K^+ -ATPase, isoforms, ouabain, smooth muscle, colon.

1. Blanco G. // Semin.Nephrol. – 2001. – **73**, N 5. – P. 17–22.
2. Lingrel J., Moseley A., Dostanic I. et al. // Ann. NY Acad. Sci. – 2003. – **986**. – P. 354–359.
3. Капля А. А., Мищук Д. О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 5. – С. 17–22.
4. Капля А. А., Морозова В. С. // Там же. – 2010. – **82**, № 1. – С. 5–20.
5. Капля А. А., Кравцов А. В. // Успехи соврем. биол. – 1999. – **119**, № 1. – С. 84–94.
6. Burke E. P., Sanders K. M., Horowitz B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – **88**, N 6. – P. 2370–2374.
7. Ghosh B., Chakraborti T., Kar P. et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2009. – **323**, N 1–2. – P. 169–184.
8. Turi A., Somogyi J., Mullner N. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1991. – **174**, N 2. – P. 969–974.
9. Floyd R. V., Wray S., Quenby S. et al. // Reprod. Sci. – 2010. – **17**, N 4. – P. 366–376.
10. Shelly D. A., He S., Moseley A. et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2004. – **286**, N 4. – P. C813–C820.
11. Ishida Y., Paul R. J. // J. Smooth Muscle Res. – 2005. – **41**, N 5. – P. 235–245.
12. Jorgenson P. L. // Biochim. Biophys. Acta. – 1974. – **356**, N 1. – P. 36–52.
13. Капля А. А., Кудрявцева А. Г., Хижняк С. В. и др. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 4. – С. 90–96.
14. Emanuel J. R., Schulz J., Zhou X. M. et al. // J. Biol. Chem. – 1988. – **263**, N 16. – P. 7726–7733.
15. Sweadner K. J. // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – **988**, N 2. – P. 185–220.

Получено 31.05.2011