

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА НА АКТИВНОСТЬ АТР-ГИДРОЛАЗ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ГЛАДКИХ МЫШЦ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ И ПОЧЕК КРЫСЫ

А. А. КАПЛЯ

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

*Для выяснения особенностей структурной устойчивости АТР-гидролаз в мембране при действии прооксидантов:  $Fe^{2+}$  и пероксида водорода, а также N-этилмалеимида (NEM) проведено сравнение  $Na^+, K^+$ -АТРазной активности гладких мышц ободочной кишки (ГМОК) с активностью соответствующей  $Mg^{2+}$ -АТР-гидролазы и АТРаза мозгового слоя почек крысы. Установлено, что при 0,1 мкМ концентрации  $FeSO_4$  активность  $Na^+, K^+$ -АТРаза ГМОК снижается почти на 30%, а в диапазоне 0,1–10 мкМ – до 45% остаточной активности. При сравнении с энзимом почек (исключительно  $\alpha 1$ -изоформа) чувствительность  $Na^+, K^+$ -АТРаза ГМОК к  $Fe^{2+}$  достоверно выше при его субмикромольной концентрации.  $Mg^{2+}$ -АТРаза ГМОК значительно более устойчива к действию ионов железа, чем энзим почек, но в обоих случаях ее чувствительность значительно ниже, чем соответствующей  $Na^+, K^+$ -АТРаза.  $Na^+, K^+$ -АТРазная и  $Mg^{2+}$ -АТРазная активность ГМОК и почек одинаково малочувствительна к действию пероксида водорода в концентрациях до 1 мМ на фоне 1 мМ ЭГТА. В то же время в присутствии 20 мкМ  $FeSO_4$  в диапазоне концентраций  $H_2O_2$  1 нМ – 1 мМ  $Na^+, K^+$ -АТРаза ингибируется в значительно большей степени, чем  $Mg^{2+}$ -АТРаза. Чувствительность к NEM двух АТР-гидролазных систем ГМОК находится в соответствии с прооксидантной чувствительностью, что указывает на различия в значимости SH-групп для проявления их функциональной активности. Сделан вывод, что  $Na^+, K^+$ -АТРаза может служить маркером чувствительности мембран к окислению, а  $Mg^{2+}$ -АТРаза (устойчивая к окислению) может быть критерием окислительной резистентности мембранного энзимного комплекса при сравнении с другими мембранными энзимами, особенно в ГМОК.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: АТР-гидролазы,  $Na^+, K^+$ -АТРаза, гладкие мышцы ободочной кишки, почки, прооксиданты, ионы железа, пероксид водорода, N-этилмалеимид.*

**И**звестно, что в патогенезе многих заболеваний важное место отводится механизмам развития окислительного стресса [1]. Пероксид водорода является одним из важнейших метаболитов в клетках. В то же время, дисбаланс между прооксидантными эффекторами и антиоксидантным потенциалом клеток, приводит к неконтролируемому развитию свободнорадикальных процессов. В свою очередь, ионы железа относятся к эссенциальным ионам, необходимым для функционирования многих важнейших биохимических систем организма. Нарушение гомеостаза железа в организме (гемохроматоз), хроническая «перегрузка» организма железом приводит к развитию хронического токсикоза, патологических структурно-функциональных изменений в клетках,

нарушению их окислительно-восстановительного баланса и даже к развитию злокачественных новообразований [2–5]. Поэтому поиск возможных биохимических мишеней в потенциальных эффекторных органах важен для выяснения механизмов патогенеза и оценки риска развития ряда патологий.

$Na^+, K^+$ -АТРаза (АТР-фосфогидролаза, 3.6.1.37) – ключевой интегральный конформационно-лабильный энзим плазматических мембран, осуществляющий энергозависимую противонаправленную трансмембранную транслокацию ионов  $Na^+$  и  $K^+$ , сопряженную с гидролизом АТР, в результате циклической последовательности конформационных превращений (конформационный цикл энзима). В связи с фундаментальной универсальной функцией

ензим вовлечен в развитие многих физиологических и патологических состояний организма, сопровождающихся изменениями структуры и физико-химических свойств клеточных мембран, метаболизма, регуляторных механизмов. В свою очередь,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза является непосредственной мишенью действия патофизиологических и повреждающих факторов окружающей среды или претерпевает адаптацию к новым условиям функционирования клеток и тканей организма [6–12].

В отличие от ионтранспортирующих АТРаз Р-типа, представителем которых является  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимые АТР-гидролазы характеризуются спецификой структурных и функциональных свойств, особенностями субмембранной локализации, механизмом гидролиза АТР, в транспорт ионов они непосредственно не вовлечены [13, 14].

Сравнительное исследование активности этих АТР-гидролаз при мембранотропных воздействиях важно для выяснения структурно-функциональных свойств мембранных комплексов энзимов с разным механизмом гидролиза АТР и особенностей устойчивости к действию ряда патофизиологических факторов в мембранных препаратах из тканей со спецификой чувствительности к развитию ишемии или интоксикации тяжелыми металлами. Известно, что  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза рассматривается как потенциальная мишень оксидативного стресса [15]. Функциональные нарушения  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза происходят при развитии ряда патологий почечного эпителия, в том числе при ишемии, сопровождаясь снижением ее активности [16, 17]. Кроме того,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза почек является гомогенной по изоформному составу каталитической субъединицы и содержит исключительно  $\alpha 1$ -изоформу [7, 8], что важно при сравнении с энзимными комплексами с малоизученным изоэнзимным составом, в частности из гладких мышц ободочной кишки (ГМОК) [18, 19], и возможной спецификой чувствительности изоформ к прооксидантам [20].

Цель исследований заключалась в изучении особенностей чувствительности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза клеточных мембран ГМОК крысы при действии прооксидантов (ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и/или  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) при сравнении с активностью  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза и АТРаз мозгового слоя почек.

## Материалы и методы

Постмитохондриальную мембранную фракцию получали из мозгового вещества почек и из гладкой мышцы ободочной кишки крыс в присутствии ЭДТА в соответствии с методическими условиями, описанными ранее [18]. Конечный мембранный осадок суспендировали в среде выделения, не содержащей ЭДТА.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазная активность препаратов составляла 50–60 и 13–17 мкмоль  $\text{P}_i$ /час на 1 мг протеина для почек и гладких мышц ободочной кишки крыс соответственно.  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазная активность составляла 25–35 мкмоль  $\text{P}_i$ /час на 1 мг протеина.

Концентрацию протеина определяли методом Лоури с использованием 1%-го раствора DSNa для солубилизации мембран [21]. Для демаскирования латентной АТРазной активности мембраны предварительно инкубировали с 0,2%-ым дигитонином (1 мг детергента/1 мг протеина = 1/1) при 23 °С 15 мин в среде, содержащей: 30 мМ трис-НСl (рН 7,54), 0,16 М сахарозу, 2 мг/мл протеина, 2 мг/мл дигитонина в соответствии с методическими принципами, применяемыми ранее [22, 23]. Аликвоты 5–10 мкл немедленно вносили в среду прединкубации с прооксидантами (пероксид водорода и/или  $\text{FeSO}_4$ ) без ЭГТА (конечный объем 0,45 мл), содержащей все стандартные компоненты АТРазной реакции [22], кроме АТР, инкубировали 30 мин при 37 °С. АТРажную реакцию запускали внесением 50 мкл смеси 3 мМ АТР- $\text{Na}_2$  и 1 мМ ЭГТА (конечные концентрации). Воздействие самого пероксида водорода оценивали на фоне 1 мМ ЭГТА для исключения влияния примесных двухвалентных металлов.  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРажную активность определяли на фоне 2 мМ уабаина с учетом спонтанного гидролиза АТР. При изучении влияния N-этилмалеимида (NEM) алкилирующий агент вносили в среду прединкубации или непосредственно в среду АТРазной реакции. В первом случае обработанные дигитонином мембраны вносили в среду, содержащую 30 мМ трис-НСl (рН 7,54 при 23 °С), 1 мМ ЭГТА 1–5 мМ NEM, инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали внесением 10 мМ дитиотреитола (в конечной концентрации) при охлаждении. Аликвоты вносили в среду АТРазной реакции. Неорганический фосфат определяли по методу [24].  $\text{H}_2\text{O}_2$  в исследованном кон-

центрационном диапазоне (при концентрации до 0,1 мМ в среде окраски) не влияет на определение  $P_i$ . Значения кажущихся констант ингибирования  $I_{0,5}$  рассчитывали стандартным образом с использованием линеаризованных графиков Хилла в координатах  $\lg(A/A_0 - A) = f(\lg[I])$ , где  $A_0$  – удельная активность без ингибитора, а  $A$  – в присутствии ингибитора (прооксидантов или NEM) в концентрации  $I$ .

Статистический анализ и аппроксимацию кривых проводили общепринятыми методами статистики с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и OriginPro 7.0. Достоверность различий между средними величинами оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Исследование ингибирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ионами двухвалентного железа (рис. 1) свидетельствует об эффективной инактивации энзима, начиная с субмикромольных концентраций  $\text{FeSO}_4$ . Для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ГМОК при 0,1 мкМ концентрации  $\text{Fe}^{2+}$  энзиматическая активность уменьшается почти на 30%, а в диапазоне 0,1–10 мкМ – до 45% остаточной активности. По сравнению с энзимом почек чувствительность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ГМОК к

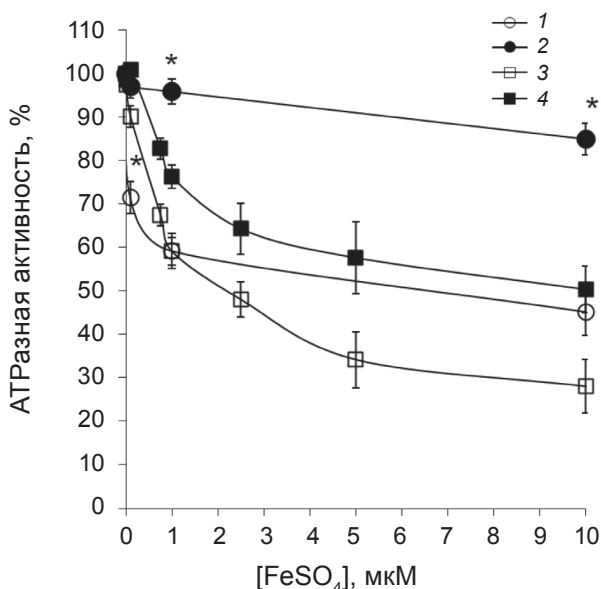


Рис. 1. Влияние  $\text{Fe}^{2+}$  на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазную (1, 3) и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную (2, 4) активность мембранной фракции ГМОК (1, 2) и почек (3, 4) крысы ( $M \pm m$ ,  $n = 4-10$ ). \* $P \leq 0,05$  относительно энзима почек. 100% – активность в отсутствие  $\text{Fe}^{2+}$

инактивации ионами  $\text{Fe}^{2+}$  достоверно выше при его субмикромольной концентрации. Однако кажущиеся константы ингибирования ионами железа сходны и составляют:  $I_{50} = 2,25 \pm 0,50$  и  $4,65 \pm 2,29$  мкМ ( $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ ), для энзимов почек и ГМОК соответственно.

$\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза ГМОК значительно более устойчива к действию ионов железа, чем подобная энзиматическая активность почек (85 и 50% остаточной активности при 10 мкМ  $\text{FeSO}_4$  соответственно). Однако в каждой из двух тканей  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазная активность всегда более чувствительна к инактивации ионами  $\text{Fe}^{2+}$  по сравнению с соответствующей  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазной активностью (рис. 1).

На фоне 1 мМ ЭГТА  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазная и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазная активность ГМОК и почек сходным образом малочувствительна к действию пероксида водорода в концентрациях до 1 мМ (рис. 2, 3). Однако в присутствии  $\text{FeSO}_4$  и в отсутствие ЭГТА инактивация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы происходит как при физиологических концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\geq 1-10$  нМ), так и в цитолитическом диапазоне ( $\geq 1$  мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). В этих условиях закономерное развитие стадии генерации гидроксильных радикалов, которая катализируется ионами двухвалентных переходных металлов [1]. Таким образом, сам по себе пероксид водорода, являясь слабым прооксидантом, практически не оказывает воздействие на функциональные свойства мембранных комплексов  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. В других исследованиях [25] была установлена низкая чувствительность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы из разных тканей к  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Степень инактивации пероксидом водорода определяется эффектом ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и является индикатором их концентрации, а наличие инактивации энзима, особенно на фоне физиологических концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$ , указывает на их присутствие в среде.

$\text{Mg}^{2+}$ -АТФазная активность менее подвержена инактивации в этих условиях, чем  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазная активность. При 20 мкМ  $\text{FeSO}_4$  в диапазоне концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 нМ – 1 мМ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза ГМОК ингибируется в значительно большей степени (до 50% остаточной активности), чем  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза – до 80% (рис. 2). Однако энзимы из почек более чувствительны к действию  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$  по сравнению с таковыми из ГМОК (рис. 3). Так, инактивация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы существенна даже на фоне 1 мкМ  $\text{Fe}^{2+}$ . При 20 мкМ  $\text{FeSO}_4$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза почек ингиби-

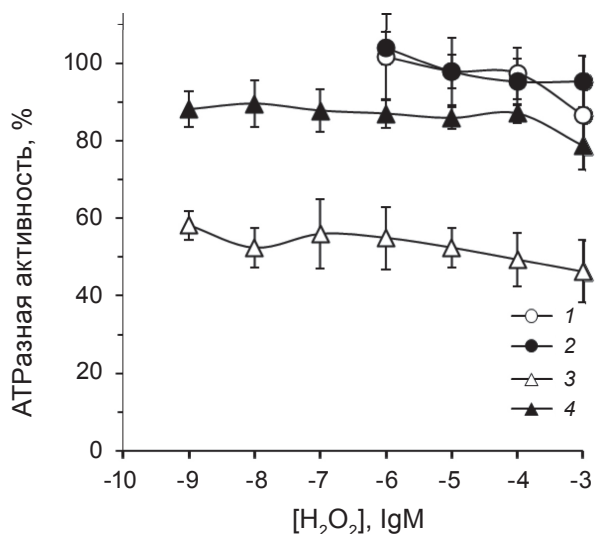


Рис. 2. Влияние  $H_2O_2$  на  $Na^+,K^+$ -АТФазную (1, 3) и  $Mg^{2+}$ -АТФазную (2, 4) активность ГМОК в присутствии 1 мМ ЕГТА (1, 2) или 20 мкМ  $FeSO_4$  (3, 4) ( $M \pm m$ ,  $n = 4$ ). Тут и на рис. 3: 100% – активность АТФазы без эффектора

руется до 25% остаточной активности, а  $Mg^{2+}$ -АТФазы – до 60%. Значительная степень инактивации  $Na^+,K^+$ -АТФазы почек в присутствии  $Fe^{2+} + H_2O_2$  указывает на структурную деградацию энзима в системе генерации гидроксильных радикалов  $OH\cdot$  (реакция Фентона) [1]. Известно, что гидроксильные радикалы – наиболее агрессивные окислители биохимических систем клет-

ки, в том числе  $Na^+,K^+$ -АТФазы [15, 26]. Показано, что связывание ионов переходных металлов на определенных сайтах полипептидной цепи  $Na^+,K^+$ -АТФазы при наличии пероксида водорода приводит к сайт-селективному расщеплению полипептидной цепи энзима [27, 28]. Очевидно, данный феномен является более специфичным для  $Na^+,K^+$ -АТФазы, чем для  $Mg^{2+}$ -АТФазы. Полученные результаты соответствуют данным литературы, полученным для других тканей [29].

Таким образом, различия в чувствительности  $Na^+,K^+$ -АТФазы и  $Mg^{2+}$ -АТФазы к действию прооксидантов свидетельствуют об особенностях структурно-функциональной организации протеин-липидных комплексов этих энзиматических систем в клеточных мембранах как ГМОК, так и почек.

Для дальнейшего выяснения отдельных структурных различий в устойчивости энзиматических систем к окислению проведено сравнительное изучение чувствительности двух АТФ-гидролазных комплексов ГМОК к действию сульфгидрильного реагента NEM (рис. 4).  $Na^+,K^+$ -АТФазная активность ГМОК в большей степени ингибируется NEM в сравнении с  $Mg^{2+}$ -АТФазной активностью в условиях прединкубации с NEM без лигандов и в его присутствии в полной АТФазной среде. Очевидно, что во втором случае, конформационная стабилизация  $Na^+,K^+$ -АТФазы в присутствии ее

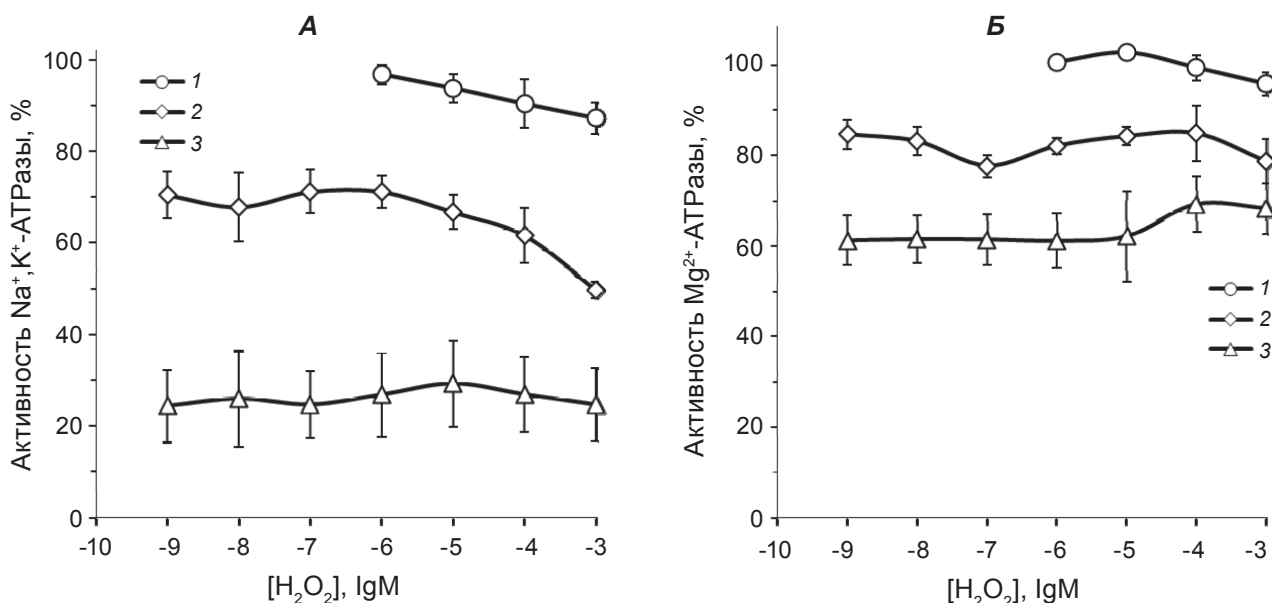


Рис. 3. Влияние  $H_2O_2$  на  $Na^+,K^+$ -АТФазную (А) и  $Mg^{2+}$ -АТФазную (Б) активность почек в присутствии 1 мМ ЕГТА (1) или 1 мкМ (2), или 20 мкМ  $FeSO_4$  (3) ( $M \pm m$ ,  $n = 3-4$ )

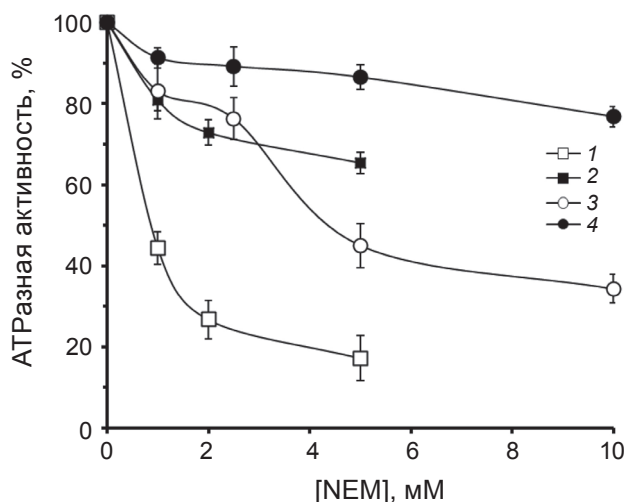


Рис. 4. Влияние *N*-этилмалеимида (NEM) на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРАЗную (1, 3) и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗную (2, 4) активность ГМОК в условиях прединкубации с NEM (1, 2) или его присутствия в АТРАЗной среде (3, 4) См. «Материалы и методы» ( $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ )

эссенциальных лигандов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ) в значительной степени защищает фермент от ингибирования NEM. При этом величина  $I_{50}$  по NEM составляет  $4,68 \pm 0,58$  мМ по сравнению с  $I_{50} = 0,86 \pm 0,15$  мМ в случае прединкубации мембран с NEM ( $P \leq 0,05$ ,  $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ ). Данные свидетельствуют о различиях в функциональной значимости нативных SH-групп в каталитических механизмах исследуемых АТФ-гидролаз. Показано, что каталитическая активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРАЗы в значительной степени зависит от нативности функциональных сульфгидрильных групп в активном центре фермента. Анализ данных литературы и собственные исследования свидетельствуют о высокой чувствительности SH-групп к окислению, в том числе при действии гидроксильных радикалов, что лежит в основе механизма инактивации фермента из других тканей [7].

Следует подчеркнуть, что  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРАЗ почечек представлена исключительно  $\alpha 1$ -изоформой [7, 8], которая превалирует и в ГМОК, где, очевидно, присутствует дополнительная минорная убаинчувствительная изоформа [18, 19], что характерно и для ряда других гладких мышц [30, 31]. Однако влияние изоэнзимного состава на специфику окислительной инактивации  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРАЗы в препаратах ГМОК и почечек не

является очевидным. Скорее всего важное значение для обеспечения относительной окислительной чувствительности АТФ-гидролаз имеет структурно-функциональная организация их протеин-липидных комплексов в мембранах и окислительный потенциал самих мембран.

Таким образом, независимо от окислительных путей эффект ингибирования обусловлен тканевыми особенностями способности к окислению мембранных комплексов АТФ-гидролаз. Эффективность ингибирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРАЗы может служить маркером чувствительности мембран к окислению. При этом  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРАЗная активность всегда устойчива к окислительной инактивации и может служить критерием резистентности к окислению при сравнительной оценке мембранных ферментных комплексов. В большей степени это выражено для гладкомышечной  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-гидролазы ободочной кишки. В наших исследованиях прооксидантная чувствительность ферментативной АТФ-гидролитической системы соответствует ее чувствительности к модификации SH-групп. В то же время функциональное значение специфики окислительной чувствительности АТФ-гидролаз *in vivo* в развитии определенных эпителиальных патологий почек или гладкомышечных клеток в условиях окислительного стресса или интоксикации металлами требует специальных исследований.

#### ВПЛИВ ІОНІВ ЗАЛІЗА НА АКТИВНІСТЬ АТФ-ГІДРОЛАЗ КЛІТИННИХ МЕМБРАН ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ОБОДОВОЇ КИШКИ ТА НИРОК ЩУРА

О. А. Капля

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

З метою з'ясування особливостей структурної стійкості АТФ-гидролаз у мембрані за дії прооксидантів:  $\text{Fe}^{2+}$  і пероксиду водню, а також *N*-етилмалеїміду (NEM) проведено порівняння  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРАЗної активності гладеньких м'язів ободової кишки (ГМОК) з активністю відповідної  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-гидролази і АТРАЗ мозкової речовини нірок щурів. Установлено, що за 0,1 мкМ концентрації  $\text{FeSO}_4$

активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ГМОК знижується майже на 30%, а в діапазоні 0,1–10 мкМ – до 45% залишкової активності. За порівняння з ензимом нирок (виключно  $\alpha 1$ -ізоформа) чутливість  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ГМОК до  $\text{Fe}^{2+}$  вірогідно вище за його субмікромолярної концентрації.  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ГМОК значно резистентніша до дії іонів  $\text{Fe}^{2+}$ , ніж ензим нирок, проте в обох випадках її чутливість значно нижче, ніж відповідної  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ГМОК і нирок однаково малочутливі до дії пероксиду водню за концентрацій до 1 мМ на тлі 1 мМ ЕГТА. Водночас у присутності 20 мкМ  $\text{FeSO}_4$  в діапазоні концентрацій  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 нМ – 1 мМ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза інгібується значно більшою мірою, ніж  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза. Чутливість до НЕМ двох АТР-гідролазних систем ГМОК є відповідною до прооксидантної чутливості, що вказує на відмінності в значимості SH-груп для виявлення їхньої функціональної активності.

Дійшли висновку, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза може слугувати маркером чутливості мембран до окислення, а  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза (резистентна до окислення) може бути критерієм окисної резистентності мембранного ензимного комплексу за порівняння з іншими мембранними ензимами, особливо ензимами ГМОК.

**Ключові слова:** АТР-гідролази,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза, гладенькі м'язи ободової кишки, нирки, прооксиданти, іони заліза, пероксид водню, N-етилмалеїмід.

### THE INFLUENCE OF IRON IONS ON ATP-HYDROLASES ACTIVITY OF CELL MEMBRANES OF RAT COLON SMOOTH MUSCLE AND KIDNEY

A. A. Kaplya

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

To elucidate the specific features of the ATP-hydrolases structural resistance in the membrane under the action of the prooxidants:  $\text{Fe}^{2+}$  and hydrogen peroxide, and N-ethylmaleimide (NEM) the colonic smooth muscle (CSM)  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was compared with activities of the corresponding  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-hydrolase and ATP-ases from kidney medullar layer of rats. The inhibition study of the CSM  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase by divalent iron shows

the decrease of the activity by 30% at 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  and in the range of 0.1-10  $\mu\text{M}$  – to 45% of residual activity. When comparing with kidney enzyme (represents exclusively  $\alpha 1$ -isozyme) the CSM  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase sensitivity to  $\text{Fe}^{2+}$  is reliably higher at its submicromolar concentration. CSM  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase is much more resistant to iron ions effect, than kidney one. However for two tissues  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity is always more resistant as compared with corresponding  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. Against 1 mM EGTA  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities of GМОK and kidneys are equally insensitive to effect of hydrogen peroxide in concentration up to 1 mM. But in the presence of 20  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  in the concentration range of 1 nM – 1 mM of  $\text{H}_2\text{O}_2$  the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is inhibited to greater extent, than  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity. NEM sensitivity of the two ATP-hydrolase systems corresponds to prooxidant sensitivity that indicates the distinct importance of SH-groups for their functioning.

It is concluded that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase can serve as a marker of membrane sensitivity to oxidation,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase is resistant to oxidation and can be considered as criterion of the oxidation resistance when comparing membrane enzyme complexes, especially in GМОK.

**Key words:** ATP-hydrolases,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, colonic smooth muscle, kidney, prooxidants, ferrum ions, hydrogen peroxide, N-ethylmaleimide.

### References

1. Baraboy V. A., Sutkovoy D. A. Oxidative and antioxidative homeostasis in norm and pathology. Kiev: Chernobylinform, 1997. 420 p. (In Russian).
2. Lubianova I. P. Modern concepts about the methabolism of iron from the position of the occupational pathologist. *Actual problems of transport medicine*. 2010;20(2):47-57. (In Russian).
3. Iron overloading deseases (hemochromatosis). Ed. By A. G. Rummianceva and Yu. N. Tokareva. M: Medpractica Press, 2004. 325 p. (In Russian).
4. Belous A. M., Konnic A. T. Physiological role of iron. Kiev: Naukova Dumka, 1991. 104 p. (In Russian).
5. Iron and human disease. Ed. By Randall BnLauffer. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor: London – Tokio, 1992. 534 p.

6. Lingrel J. B., Kuntzweiler T. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 1994;269(31):19659-19662.
7. Kaplia A. A. Structural organization and functional role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isozymes. Kiev: Kiev University Press, 1998. 162 p. (In Russian).
8. Blanco G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin. Nephrol.* 2001;73(5):17-22.
9. Lingrel J., Moseley A., Dostanic I., Cougnon M., He S., James P., Woo A., O'Connor K., Neumann J. Functional roles of the alpha isoforms of the Na,K-ATPase. *Ann. NY Acad. Sci.* 2003;986:354-359.
10. Kaplia A. A., Mishchuk D. O. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isoenzymes of excitable tissues in pathological states. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2001;73(5):17-22. (In Russian).
11. Kaplya A. A., Hizhnyak S. V., Kudryavceva A. G., Papageorgakopoulou N., Osinsky D. S. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase isozymes in malignant neoplasms. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2006;78(1):29-42. (In Russian).
12. Kaplia A. A., Morozova V. S. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in polarized cells. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2010;82(1):5-20. (In Russian).
13. Knowles A. F., Isler R. E., Reece J. F. The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983;731(1):88-96.
14. Knowles A. F., Chiang W. C. Enzymatic and transcriptional regulation of human ecto-ATPase/E-NTPDase 2. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003;418(2):217-227.
15. Boldyrev A. A., Bulygina E. R., Kramarenko G. G. Is Na,K-ATPase the target of oxidative stress? *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1996; Mar;121(3):275-278. (In Russian).
16. Kako K., Kato M., Matsuoka T., Mustapha A. Depression of membrane-bound Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.* 1988;254(2, Pt 1):C330-337.
17. Rajasekaran A. K., Rajasekaran S. A. Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight Junctions. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003;285(3):F388-396.
18. Kaplia A. A. The heterogeneity of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ouabain sensitivity in microsomal membranes of rat colon smooth muscles. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2011;83(5):89-93. (In Russian).
19. Burke E. P., Sanders K. M., Horowitz B. Sodium pump isozymes are differentially expressed in electrically dissimilar regions of colonic circular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88(6):2370-2374.
20. Xie Z., Jack-Hays M., Wang Y., Periyasamy S. M., Blanco G., Huang W. H., Askari A. Different oxidant sensitivities of the alpha1 and alpha2 isoforms of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase expressed in baculovirus-infected insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995;207(1):155-159.
21. Cadman E., Bostwick J. R., Eichberg J. Determination of protein by modified Lowry procedure in the presence of some commonly used detergents. *Anal. Biochem.* 1979;96(1):21-23.
22. Kaplia A. A., Kudryavceva A. G., Hizhnyak S. V., Osinsky D. S., Dyomin E. N. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity characteristics in human colon adenocarcinoma. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2007;79(4):90-96. (In Russian).
23. Kaplya O., Khyzhnyak S., Kudryavceva A., Dyomin E., Osynski D. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase functioning in human colorectal adenocarcinomas depending on tumor differentiation. *Annales Universitatis Mariae-Sklodowska (Lublin, Polonia). Sectio DDD.* 2008;21(1):303-305.
24. Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 1956;28(11):1756-1758.
25. Huang W. H., Wang Y., Askari A., Zolotarjova N., Ganjeizadeh M. Different sensitivities of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoforms to oxidants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994;1190(1):108-114.
26. Huang W. H., Wang Y., Askari A. (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase inactivation and degradation induced by oxygen radicals. *Int. J. Biochem.* 1992;24(4):621-626.
27. Goldshleger R., Bar Shimon M., Or E., Karlsh S. J. Metal-catalysed cleavage of Na,K-ATPase as a tool for study of structure-function relations. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1998;643:89-97.
28. Goldshleger R., Patchornik G., Shimon M. B., Tal D. M., Post R. L., Karlsh S. J. Structural organization and energy transduction mechanism of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase studied with transition metal-catalyzed oxidative cleavage. *Bioenerg. Biomembr.* 2001;33(5):387-399.
29. Krstić D., Krinulović K., Vasić V. Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase by metal ions and prevention and recovery of inhibited activities by chelators. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* 2005;20(5):469-476.

30. Floyd R. V., Wray S., Quenby S., Martín-Vasallo P., Mobasher A. Expression and distribution of Na, K-ATPase isoforms in the human uterus. *Reprod. Sci.* 2010;17(4):366-376.
31. Shelly D. A., He S., Moseley A., Weber C., Stegemeyer M., Lynch R. M., Lingrel J., Paul R. J.

Na(+) pump alpha 2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004;286(4):C813-C820.

Получено 10.06.2014