

С. В. Яблонська, В. П. Лозовий, О. М. Філінська,  
В. К. Рибальченко

## Вплив регуляторів росту рослин івіну й потейтину на активність мембранозв'язаних ферментів клітин печінки щурів

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

*Івін та потейтин як регулятори росту рослин пригнічують  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазну активність плазматичної мембрани клітин печінки щурів у концентраціях  $10^{-9}$  й  $10^{-4}$  моль/л. Під впливом регуляторів росту спостерігається параболічна концентраційна залежність АТФазної активності *in vitro*. Екто-АТФаза та 5'-нуклеотидазна активності не є чутливими до впливу івіну й потейтину, а  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФаза активність маловірогідно змінюється.*

Для підвищення врожайності культурних рослин у сільському господарстві широко використовуються регулятори росту. До них належать похідні піридину — івін (N-оксид-2,6-диметилпіридин) та його комплекс із сукцинатом — потейтин [1], вплив яких на організм тварин і людей практично не досліджений. Деякі похідні піридину здатні пригнічувати секреторну активність шлунку кролів шляхом специфічного інгібування шлункової  $\text{H}^+, \text{Na}^+$ -АТФази, що використовується у лікуванні виразок [2]. На штучних бішарових [3] та моношарових [4] ліпідних мембранах встановлено, що івін і потейтин як мембраноактивні речовини здатні вбудовуватися в ліпідний матрикс. Івін знижує токсичний вплив низки пестицидів на рослини та мікроорганізми ґрунту [1].

Одним з чутливих показників впливу біологічно активних речовин (БАР) на плазматичну мембрану (ПМ) клітини є зміна активності мембранозв'язаних ферментів, таких як  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФаза (СЕ 3.6.1.38) та  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза (СЕ 3.6.1.37), що регулюють іонний гомеостаз у клітині [5, 6]. Порушення їх роботи призводить до змін внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}, \text{Na}^+$  й  $\text{K}^+$ , що може спричинити низку метаболічних змін у клітині. Безпосереднього впливу БАР зазнають також мембранні ектоферменти, активні центри яких орієнтовані в позаклітинне середовище, зокрема екто-АТФаза (СЕ 3.6.1.3) та 5'-нуклеотидаза (СЕ 3.6.1.5). Порушення активності цих ферментів під впливом БАР, у свою чергу, викликає дисбаланс позаклітинної регуляції.

Чутливість мембранозв'язаних АТФаз до будь-яких хімічних агентів, до яких також належать івін і потейтин, може визначатися тісним структурно-функціональним зв'язком між цими ферментами та ліпідним матриксом мембрани — первинною мішенню для дії речовин різної природи, а також безпосередньою взаємодією цих речовин із мембранозв'язаними ферментами [6, 7], що спричинює їх неспецифічне пригнічення або активацію.

Метою роботи було дослідити вплив регуляторів росту рослин івіну й потейтину на активність мембранозв'язаних ферментів ( $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФаза,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза, 5'-нуклеотидаза, екто-АТФаза) ПМ гепатоцитів щурів.

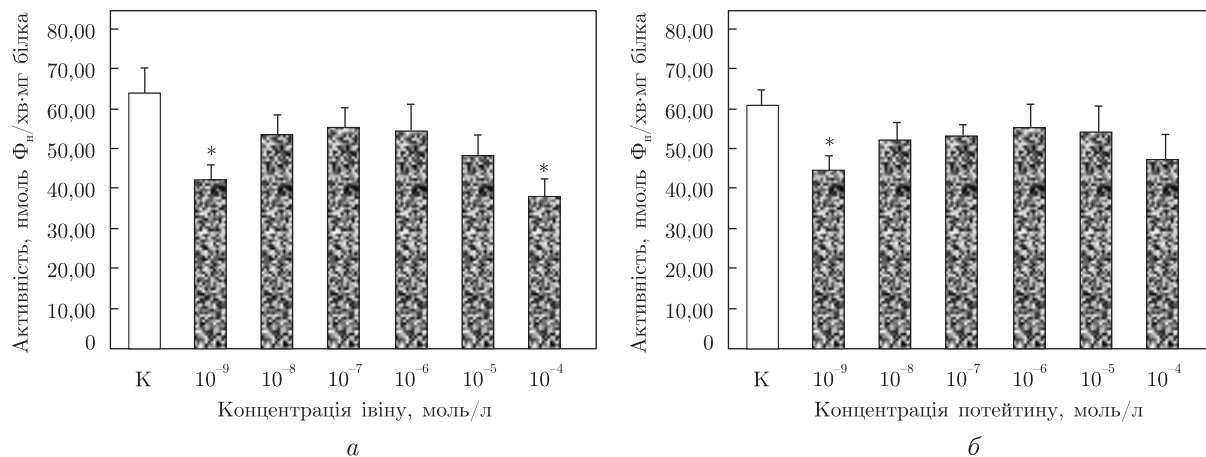


Рис. 1.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазна активність ПМ гепатоцитів щурів при дії івіну (а) й потейтину (б) у діапазоні концентрацій  $10^{-9}$ – $10^{-4}$  моль/л; контроль (К) — активність ферменту в фракції ПМ у відсутності досліджуваних речовин.

Зірочка (\*) —  $p < 0,01$  відносно контролю.  $M \pm m$ ,  $n = 7$

Експерименти проведено на 30 білих щурах-самцях масою 180–200 г. ПМ гепатоцитів печінки щурів виділяли методом ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози [8]. Вміст білка в отриманій фракції визначали методом Лоурі (J. Biol. Chem., 1951, **193**, No 1). Для вимірювання 5'-нуклеотидазної активності вміст ПМ у реакційній суміші дорівнював 20 мкг на 0,5 мл середовища інкубації такого складу, ммоль/л: 1  $\text{MgCl}_2$ , 4 АМФ, 50 *tris*-HCl, рН 7,5 [9]. Екто-АТФазну активність ПМ гепатоцитів [10] визначали за різницею між АТФазною активністю у середовищі, яке містить  $\text{Ca}^{2+}$  (2 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$ ) і без цих іонів. Вміст ПМ у реакційній суміші дорівнював 20 мкг білка на 0,5 мл середовища інкубації такого складу, ммоль/л: 140 NaCl, 5 KCl, 0,1  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , 50 *tris*-HCl, 3  $\text{NaN}_3$ , 0,001 додецилсульфату натрію (ДСН), 1 АТФ, рН 7,5.  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазну активність ПМ гепатоцитів [8] вимірювали у середовищі загальним об'ємом 0,5 мл: 100 ммоль/л KCl, 3 ммоль/л  $\text{MgCl}_2$ , 0,06 ммоль/л ЕГТА, 50 ммоль/л *tris*-HCl, 3 ммоль/л  $\text{NaN}_3$ , 1 мкмоль/л ДСН, 3 ммоль/л АТФ, рН 7,5, що містить фракцію ПМ у кількості 20 мкг за білком. Фермент активували додаванням 0,04 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$ .  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазну активність ПМ гепатоцитів визначали за різницею між загальною АТФазною активністю й активністю у середовищі, яке містить її специфічний блокатор — убаїн ( $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л). За основу взято метод Pressley [11]. Вміст мембранного препарату в реакційній суміші дорівнював 50 мкг на 0,5 мл інкубаційного середовища такого складу, ммоль/л: 130 NaCl, 20 KCl, 5  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 ЕДТА, 0,005 ДСН, 3  $\text{NaN}_3$ , 50 *tris*-HCl, 3 АТФ, рН 7,5. Кількість неорганічного фосфату ( $\text{P}_i$ ), що виділився в процесі АТФазної реакції, вимірювали методом Ратбуна–Бетлах [12], активність мембранозв'язаних ферментів під впливом івіну й потейтину — у фракціях ПМ гепатоцитів, додаючи в інкубаційне середовище досліджувані речовини в концентраціях від  $10^{-9}$  до  $10^{-4}$  моль/л. Математичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням програм стандартного пакета аналізу даних в Microsoft Excel. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

Івін як регулятор росту рослин у досліджуваному діапазоні концентрацій спричинює зміни  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної активності, що мають параболічний характер залежності (рис. 1, а). Під впливом івіну при концентраціях  $10^{-9}$  й  $10^{-4}$  моль/л відбувається вірогідне

зниження ферментативної активності відповідно на 34 та 40% порівняно з контролем, при концентрації  $10^{-5}$  моль/л спостерігається тенденція до зниження активності на 25% ( $p < 0,1$ ). Інші концентрації препарату викликають невірогідні коливання  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної активності. Івін у концентраціях порядку  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  моль/л не призводить до вірогідних змін екто-АТФазної та 5'-нуклеотидазної активностей (табл. 1). При його наномолярних концентраціях ( $10^{-9}$  моль/л) відзначаємо тенденцію до зниження екто-АТФазної активності на 16% ( $p < 0,5$ ) порівняно з контрольним значенням. Тенденція до зниження 5'-нуклеотидазної активності на 10–15% при дії івіну простежується в усьому діапазоні концентрацій від  $10^{-9}$  до  $10^{-4}$  моль/л. Івін не призводить і до вірогідних змін  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазної активності ПМ, лише при його наномолярній концентрації відзначаємо тенденцію до зниження активності на 19% ( $p < 0,5$ ) порівняно з контролем (рис. 2, а).

Потейтин у концентрації  $10^{-9}$  моль/л спричиняє вірогідне пригнічення  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної активності на 26% порівняно з контрольними значеннями (див. рис. 1, б). А під впливом його концентрацій  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  моль/л простежується тенденція до пригнічення  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної активності, що найбільш виражена при  $10^{-4}$  моль/л ( $p < 0,1$ ).

У досліджуваному діапазоні концентрацій потейтин спричинює маловиражені параболічні зміни і  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазної активності ПМ. Так, під впливом потейтину в концентрації  $10^{-9}$  моль/л відзначаємо тенденцію до зниження активності ферменту на 13% ( $p < 0,5$ ), а в концентрації  $10^{-6}$  моль/л — до підвищення на 19% ( $p < 0,5$ ) порівняно з активністю в контролі (див. рис. 2, б). Екто-АТФазна та 5'-нуклеотидазна активності вірогідно не змінюються в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій потейтину (див. табл. 1), хоча відбуваються певні коливання активностей цих ферментів. Так, під впливом мікромольної концентрації потейтину відзначаємо тенденцію до підвищення екто-АТФазної активності на 15% ( $p < 0,2$ ) та тенденцію до зниження на 11% ( $p < 0,2$ ) 5'-нуклеотидазної активності щодо відповідних контрольних значень.

N-Оксид-2,6-диметилпіридин є полярною молекулою з переважанням негативного заряду [1], проявляє мембранотропні властивості — він здатний взаємодіяти з фосфоліпідною мембраною, вбудовуватися в гідрофобну зону, практично не затримуючись в області полярних голівок [3, 4]. Оскільки івін не спричиняє помітного впливу на  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазну, екто-АТФазну та 5'-нуклеотидазну активності, то це, очевидно, є наслідком недостатніх для чутливості ферменту змін у ліпідному матриксі ПМ, хоч інкорпорація івіну в штучні ліпідні мембрани вірогідно знижує плинність (збільшує в'язкість) бімолекулярного ліпідного матриксу.

Більш виражені зміни  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної активності (порівняно з  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазною) під впливом досліджуваних регуляторів росту рослин, можливо, зумовлені відмінностями в структурі цих іон-транспортувальних АТФаз. Так, хоч ці ферменти мають дещо подібну амінокислотну послідовність, але в молекулі  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази, крім  $\alpha$ -субодиниці, є ще один малий поліпептидний ланцюг, що формує  $\beta$ -субодиницю [13], функцією якої є регуляція активності ферменту. Це може бути причиною більш виражених змін  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної активності порівняно з  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазною.

Отже, під впливом похідних піридину — івіну й потейтину — відбуваються зміни  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазної активності ПМ клітин печінки. Зокрема, спостерігається тенденція до параболічної концентраційної залежності впливу івіну й потейтину на ферментативну активність іон-транспортувальної мембранозв'язаної АТФази, завдяки вираженому пригніченню її активності в концентраціях  $10^{-9}$  й  $10^{-4}$  моль/л. Це, ймовірно, зумовлено характером взаємодії N-оксид-2,6-диметилпіридину з ПМ, який в наномолярних концентраціях

Таблиця 1. Активність мембранозв'язаних ферментів ПМ гепатоцитів щурів під впливом регуляторів росту рослин івіну й потейтину в діапазоні концентрацій  $10^{-9}$ – $10^{-4}$  моль/л,  $M \pm m$ ,  $n = 7$

Досліджувана речовина	Контроль (без досліджуваної речовини)	Концентрація досліджуваної речовини, моль/л					
		$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Екто-АТФазна активність, нмоль $\Phi_n$ /хв · мг білка							
Івін	188,6 ± 15,6	155,5 ± 11,6	176,8 ± 14,3	184,7 ± 15,4	200,1 ± 20,8	180,6 ± 23,6	187,2 ± 24,1
Потейтин	178,4 ± 19,8	165,8 ± 17,4	169,2 ± 13,9	194,5 ± 17,1	205,8 ± 18,7	190,3 ± 13,5	178,5 ± 14,6
5'-Нуклеотидазна активність, нмоль $\Phi_n$ /хв · мг білка							
Івін	185,5 ± 9,2	166 ± 14,8	156,4 ± 16,9	155,1 ± 12,4	157,1 ± 12,4	160,1 ± 15,5	165,8 ± 19,2
Потейтин	186,1 ± 12,6	196,2 ± 21,6	168,7 ± 8,5	165,8 ± 14,4	172,5 ± 14,1	166,6 ± 16,2	165,2 ± 11,9

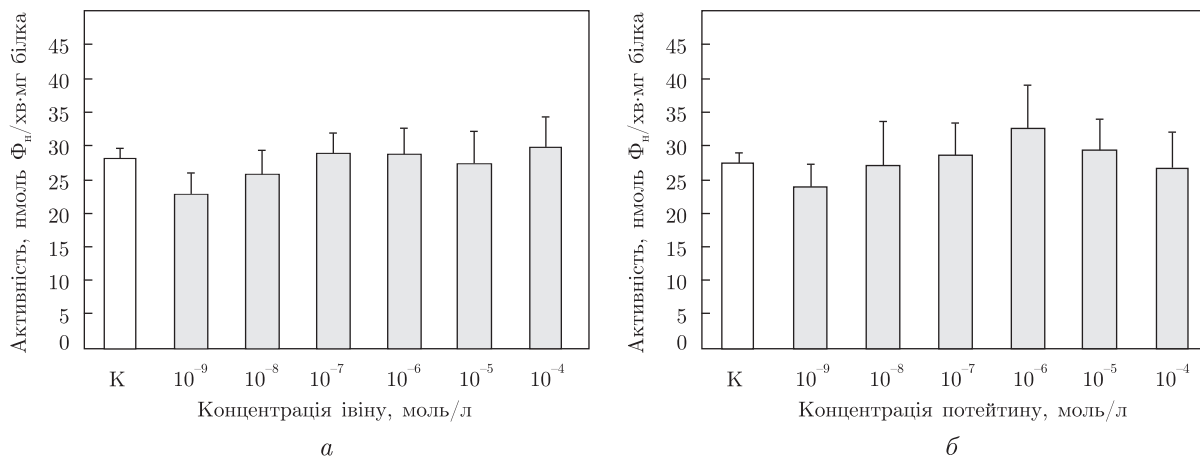


Рис. 2. Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-АТФаза активність ПМ гепатоцитів щурів при дії івіну (а) й потейтину (б) у діапазоні концентрацій 10<sup>-9</sup>–10<sup>-4</sup> моль/л; контроль (К) — активність ферменту в фракції ПМ у відсутності досліджуваних речовин.  $M \pm m$ ,  $n = 7$

здатний взаємодіяти з молекулою ферменту, а у вищих концентраціях — змінювати плинність ліпідного матриксу ПМ [3, 4]. Відсутність істотних змін під впливом івіну й потейтину активностей ектоферментів, які менш залежні від ліпідного матриксу мембрани, можливо, зумовлена відсутністю взаємодії цих сполук із молекулами цих ферментів.

Таким чином, екто-АТФаза та 5'-нуклеотидазна активності не є чутливими до івіну й потейтину *in vitro*, а Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФаза активність, на відміну від Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-АТФази, пригнічується під впливом досліджуваних регуляторів росту рослин при концентраціях 10<sup>-9</sup> й 10<sup>-4</sup> моль/л. Це може спричинити порушення іонного гомеостазу Na і K у клітині при певних концентраціях івіну й потейтину, що потрібно враховувати на виробництві і при застосуванні цих регуляторів росту рослин у сільському господарстві.

1. Пономаренко С. П. Регуляторы роста растений на основе N-оксидов производных пиридина. – Киев: Техніка, 1999. – 272 с.
2. Sung Yun Cho, Seung Kyu Kang, Sung Soo Kim et al. Synthesis and SAR of Benzimidazole Derivatives Containing Oxacyclic Pyridine as a Gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> – ATPase Inhibitors // Bull. Korean Chem. Soc. – 2001. – **22**, No 11. – P. 1217–1223.
3. Бичко А. В., Рыбальченко В. К. Модифікація рідинно-кристалічної структури бімолекулярних мембран N-оксид-2,4-лутидином (Івіном) // Фізика живого. – 2002. – № 1. – С. 39–43.
4. Лозовий В. П., Ляхов О. М., Яблонська С. В. та ін. Мембранотропна активність регуляторів росту рослин івіну та потейтину // Доп. НАН України. – 2008. – № 9. – С. 173–176.
5. Слінченко Н. М., Костерін С. О., Горчев В. Ф. Функціонування реконструйованої в ліпосомі Ca<sup>2+</sup>-транспортуючої АТФази плазматичної мембрани гладеньком'язової клітини за наявності трансмембранного градієнта іонів натрію // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 4. – С. 59–63.
6. Рыбальченко В. К., Островская Г. В. Мембранотропная активность нейрогипофизарных гормонов. – Луганск: Елтон-2, 1998. – 84 с.
7. Артюхов В. Г., Наквасин М. А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. – Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2000. – 295 с.
8. 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.
9. Matlied M. A., Crankshaw J., Lenfield R. S. et al. Characterization of membrane fractions and isolation purified plasma membrane from myometrium // J. Biol. Chem. – 1974. – **254**, No 6. – P. 1834–1840.
10. 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.

11. *Pressley T. A., Haber R. S., Loeb J. N. et al.* Stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase and active transport by low external K<sup>+</sup> in a rat liver cell line // *J. Gen. Physiol.* – 1986. – **87**, No 4. – P. 591–606.
12. *Rathbun W. B., Betlach M. V.* Estimation of enzymatically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate // *Annal. Biochem.* – 1969. – **28**. – P. 436–445.
13. *Canfield V. A., Levenson R.* Domain swapping between Na,K- and H,K-ATPase identified regions that specify Na,K-ATPase activity // *Biochemistry.* – 1998. – **37**, No 20. – P. 7509–7516.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 04.12.2009

**S. V. Yablonska, V. P. Lozovy, O. M. Filinska, V. K. Rybalchenko**

### **The influence of plant growth regulators ivin and poteitin on activity of membrane-bound enzymes of rat liver cells**

*Plant growth regulators, ivin and poteitin, depress the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of the plasma membranes of rat liver cells in concentrations of 10<sup>-9</sup> and 10<sup>-4</sup> mole/L. Parabolic concentration dependence of ATPase activity have been noted after the treatment with plant growth regulators ivin and poteitin in vitro. Ecto-ATPase and 5'-nucleotidase activities are not sensitive to in vitro influence of ivin and poteitin. Mg<sup>2+</sup>,Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity shows insignificant disturbances.*