

УДК: 616.981.452.-092.9:579.842.23:612.017.4:612(018)6:577.15.

ВЛИЯНИЕ «МЫШИНОГО» ТОКСИНА ЧУМНОГО МИКРОБА НА АКТИВНОСТЬ АТФ-АЗЫ

У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.С. Каграманов, О.С. Бурша, Л.Е. Асеева

*ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону,
Россия (344002, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117) plague@ic.ru*

В работе представлены данные по влиянию «мышинного» токсина (МТ) чумного микроба на активность АТФ-азы в клетках экспериментальных животных. Показано, что у экспериментальных животных под влиянием МТ (сублетальных доз – 0,5–1 мкг) по данным электролитного состава крови, активности АТФ-азы общей, Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺-зависимой можно диагностировать гипоксическое состояние, в частности, метаболический ацидоз.

Ключевые слова: «мышинный» токсин чумного микроба, гипоксия, АТФ-азы.

Кислород является обязательным и необходимым элементом для многочисленных биохимических реакций, протекающих в важных метаболических путях клетки. При недостаточности кислорода нарушается скорость метаболических реакций в организме, что приводит к нарушению функции клеток и органов. Roubin [6] нарушение утилизации O₂ клетками обозначает термином «дизоксия». Автор различает три вида дизоксии: 1) гипоксическая дизоксия, возникающая при снижении количества поступающего в ткани O₂, т. е. пониженное снабжение, или транспорт O₂; 2) нормоксическая дизоксия, при которой снабжение и транспорт O₂ нормальный, но нарушается утилизация O₂ на уровне субклеточных органелл (митохондрии, микросомы, пероксисомы, лизосомы, ядро и др. органеллы); 3) гипероксическая дизоксия – нарушение функции клетки при повышенном содержании O₂ или повышенной его активности (свободно-радикальные повреждения, нарушение разложения H₂O₂ – перекисные повреждения и др.).

Кислородная недостаточность, возникающая при чумной интоксикации, связана с нарушением метаболических и гуморально-метаболических факторов регуляции.

Патологические состояния, возникающие в организме при кислородном го-

лодании, проявляются на различных уровнях: на уровне целостного организма, различных органов и систем, клеточном, субклеточных фракций, молекулярном.

Среди молекулярных клеточных изменений основное место занимают нарушения процессов энергообразования и поражения клеточных мембран.

Одним из индикаторов структурно-функционального состояния плазматических мембран является АТФ-аза.

Повсеместно встречающийся в плазматической мембране (Na⁺ + K⁺) – насос – это АТФ-аза. Натриево-калиевые насосы, имеющиеся в плазматических мембранах всех животных клеток, работают по принципу антипорта, активно качая Na⁺ из клетки, а K⁺ – в клетку против градиентов концентраций (в случае же ионов Na⁺ и против электрического градиента). Избирательная проницаемость биологических мембран по отношению к простым ионам создает значительные различия в ионном составе внутреннего содержимого клетки и внеклеточной жидкости. Так, внутриклеточная концентрация (мМ) Na⁺ – 5–15, K⁺ – 140, Mg²⁺ – 30, Ca²⁺ – 1–2, внеклеточная концентрация – 145, 5, 1–2 и 2,5–5 соответственно.

Градиенты концентраций ионов Na⁺ и K⁺, поддерживаемые натриево-калиевым насосом, ответственны не только за мембранный потенциал клетки, но и за регу-

ляцию клеточного объема, а также за активный транспорт сахаров и аминокислот.

Кроме того, Na, K АТФ-аза осуществляют контроль за дыханием, регуляцию внутриклеточного значения рН и трансмембранного переноса сахаров, аминокислот, нейротрансмиттеров.

Важная роль ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) АТФ-азы в регуляции клеточного объема подтверждается тем фактом, что при обработке животных клеток убаином (C_1 -строфантин), ингибирующим ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) АТФ-азу, они разбухают и разрываются. Следует отметить, что в большинстве животных клеток основная роль в предотвращении разрыва из-за осмотического давления принадлежит ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) АТФ-азе.

Значительный шаг в понимании молекулярного механизма натриево-калиевого насоса был сделан в 1957 году, когда обнаружилось, что для оптимальной активности фермента, гидролизующего АТФ до АДФ и фосфата, требуются $\text{Na}^+ + \text{K}^+$.

Однако в плазматических мембранах эукариотических клеток обнаруживаются ферменты, действующие в обратном направлении: вместо гидролиза АТФ, обеспечивающего транспорт ионов (как в случае ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) АТФ-азы и Ca^{2+} – АТФ-азы), они катализируют синтез АТФ из АДФ и фосфата. Поэтому такие ферменты называются АТФ-синтетазами. Во всех случаях ферменты могут работать в обоих направлениях в зависимости от условий: они могут гидролизовать АТФ и качать H^+ через мембрану во внутреннее пространство или же могут синтезировать АТФ при прохождении потока ионов H^+ через молекулы ферментов в обратном направлении.

В литературе отсутствуют данные о механизмах регуляции активности данного фермента при экстремальных воздействиях.

Цель данной работы заключалась в изучении активности АТФ-азы клеток экспериментальных животных при воздействии «мышинного» токсина (МТ) чумного микроба.

Материалы и методы: изучение активности АТФ-азы проводили на спленоцитах монгольских песчанок (целых и мембранных фракций клеток). Селезенки забирали у декапитированных животных и освобождали от эритроцитов промывани-

ем 0,84%-ным раствором NH_4Cl на холоде. Для выделения мембранных фракций клетки разрушали при 4°C на ультразвуковом дезинтеграторе РУ-100 MSE 150W (Англия) с помощью цилиндрического стержня 9,5 мм при частоте колебаний 20 кГц и амплитуде 10–12 мкм. Время озвучивания составило 3 мин. Клеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования. Полученные мембранные фракции исследовались на содержание белков, обладающих АТФ-азной активностью.

Пробы содержали: 25 мМ трис-НСI буфер; рН 7,4; 100 мМ KCL; 65 мМ NaCl; 5 мМ MgCl_2 и 0,1 М АТФ. Активность измеряли в мкМ Рн на мг белка. Фосфор определяли по Фиске и Суборроу [3], белок – по Лоури [5] и методом дифференциальной спектрометрии [4].

Количество АТФ измеряли хемилюминесцентным методом с помощью стандартного набора фирмы Calbiochem (США).

Изменение АТФ-синтетазной активности мембранных фракций спленоцитов монгольских песчанок в наших экспериментах определяли параллельно двумя методами [2]. В одних опытах использовали рН-индикатор феноловый красный (30 мкМ), в других – синтетазную активность определяли в присутствии АТФ-регенирирующей системы.

Показания электролитного состава крови: $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Ca}^{++}$ и Cl получены нами на газовом анализаторе кислотно-щелочного равновесия Ciba – Korning 860 (Англия).

За 18 – 20 часов до получения крови животным вводили 0,5 мл «мышинного» токсина (0,5 – 1 мкг), контрольным – по 0,5 мл физиологического раствора. МТ получен из штамма кишечной палочки DH_{5a} , несущей рекомбинантную плазмиду с клонированным геном токсина. Молекулярная масса токсина, по данным электрофореза, составила 61 кД, Ld_{50} очищенного препарата составляла для белых мышей 1,0 – 1,2 мкг по белку.

Результаты и обсуждение

При определении электролитного состава крови у экспериментальных животных установлено, что содержание ионов Na^+ при введении «мышинного» токси-

на чумного микроба 0,5 – 1 мкг имеет тенденцию к увеличению, а K^+ увеличивается в 2,05, 1,4 1,06 у белых мышей, монгольских песчанок и морских свинок соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Содержание электролитов крови животных под влиянием «мышинного» токсина чумного микроба (мг/%)

Вид животных		«Мышинный» токсин чумного микроба $M \pm m$			
		Na^+	K^+	Ca^{++}	Cl^-
Белые мыши n=12	К	137,5±14,6	5,2±0,6	0,97±0,085	105±9,4
	О	138,2±13,8	10,7±1,2	0,61±0,07	87±9,2
Монгольские песчанки n=7	К	119,3±10,9	4,2±0,38	1,37±0,28	118±11,7
	О	128,9±12,4	6,03±0,7	1,09±0,09	94±10,1
Морские свинки n=7	К	134,7±13,7	5,8±0,64	1,20±0,12	97±9,3
	О	136,8±14,1	6,2±0,66	1,12±0,09	97±9,2

Смещение ионного равновесия происходит, по-видимому, из-за снижения активности Na , K -АТФ-азы в проведенных нами экспериментах (табл. 2).

Таблица 2

Активность АТФ-азы в клетках монгольских песчанок под влиянием токсина чумного микроба (мкМ P_n /мг белка/час)

АТФ-аза	Клетки (n=8) и цитозольная фракция	К	Опытные пробы	%
АТФ-аза (общая)	n=6 целые клетки	41,2	28,2	68 %
	цитозольная фракция	32,8	23,1	70,4 %
Ca^{++} , Mg^{++} АТФ-аза	Целые клетки	27,5	26,2	95,2 %
	цитозольная фракция	24,3	21,8	89,7 %
Na^+ , K^+ АТФ-аза	Целые клетки	13,7	2,0	14,6 %
	цитозольная фракция	8,5	1,3	15,3 %

Под влиянием МТ чумного микроба отмечалось снижение АТФ-азной активности как в целых клетках, так и мембранах. При добавлении в инкубационную среду сердечного гликозида – строфантина С (уабаин) в концентрациях $0,4 \cdot 10^{-4}$ М – 10^{-6}

М Na , K -АТФ-аза почти полностью ингибировалась.

Согласно литературным данным [1], концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле эукариотических клеток поддерживается на гораздо более низком уровне ($\leq 10^{-7}$ М). Поток ионов Ca^{2+} , устремляющийся по

столь крутому градиенту в ответ на внесение сигнала, – важный способ передачи таких сигналов через плазматическую мембрану внутрь клетки. Градиент частично поддерживается с помощью существующих в плазматической мембране Ca^{2+} -насосов, активно выводящих Ca^{2+} из клетки. Известно, что некоторые из таких насосов представляют собой АТФ-азы. Кальциевая АТФ-аза осуществляет сопряженный с гидролизом АТФ перенос ионов Ca^{2+} .

Что касается Ca^{++} АТФ-азы в наших экспериментах на спленоцитах монгольских песчанок под влиянием «мышинного» токсина чумного микроба, то они не отли-

чались от контрольных. Ионы Cl^- уменьшаются как у монгольских песчанок, так и у белых мышей и морских свинок при введении им МТ. Изменение электролитного состава крови соответствует общей направленности сдвигов показателей кислотно-щелочного гомеостаза крови. При снижении рН увеличивается содержание ионов Na^+ и K^+ в крови, а из-за повышения CO_2 наступает повышение H_2CO_3 , растворенного CO_2 и HCO_3^- , а также снижается содержание хлоридов (Cl^-).

Под влиянием токсина отмечалось снижение АТФ-синтетазной активности до 18–15,5 % по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3

АТФ-синтетазная активность (в нМ/мг/мин) мембранных фракций спленоцитов монгольских песчанок под влиянием токсина чумного микроба ($M \pm m$)

Проба	Контроль	Токсин	P
С индикатором феноловым красным (n=7)	615±102	520±90	<0,5
С АТФ регенерирующей системы	458±76	387±62	<0,5 %

Следует учесть, что мембранные препараты были гетерогенны и состояли как из «сопряженных», так и из «несопряженных» структур, из которых одни были способны к синтезу АТФ и генерации электрохимического потенциала при гидролизе АТФ, а другие характеризовались свободной проницаемостью мембран для H^+ и не синтезировали АТФ, а добавление токсина чумного микроба, вероятно, приводило к включению в гидролиз АТФ и АТФ-аз, ассоциированных с «сопряженными» участками.

Что касается количественного содержания АТФ, то токсин *Yersinia pestis* снижает количество растворимой клеточной АТФ почти наполовину (58 %) по сравнению с контрольными клетками.

Процесс окислительного фосфорилирования в клетках катализируется сложной полиферментной системой, включающей АТФ-синтетазный комплекс и локализованные на мембране компоненты дыхательной цепи, которые участвуют в генерации электрохимического потенциала ионов водорода. Внутренняя мембрана во всех клетках выполняет одинаковую

функцию, обеспечивая сопряжение окисления с синтезом АТФ. Синтез АТФ осуществляется за счет энергии мембранного потенциала и сопряжен с трансмембранным переносом H^+ .

Таким образом, у экспериментальных животных под влиянием МТ (сублетальных доз – 0,5–1 мкг) по данным электролитного состава крови, активности АТФ-азы общей, Na^+ , K^+ , Ca^{++} -зависимой можно диагностировать гипоксическое состояние, в частности, метаболический ацидоз.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Альбертс Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис [и др.]. – Т. 2. – С. 168.
2. Васильева Е.А. Биохимия / Е.А. Васильева, М.В. Панченко, А.Д. Виноградов. – 1989. – Т. 54, № 9. – С. 1490.
3. Фриске–Суббароу // J. Biol. chem. – 1925, Vol. 66. – P. 375.
4. Ehresmann B., Imbault., Wiel J.H. // Analyt. Biochem. – 1973, Vol. 54, № 2. – P. 454.

5. Lowry O.H., Rosenbrough N.Y., Farr A.L., Randal R.J. // J. Biol. chem. – 1951, Vol. 193. – P. 265.
6. Robin E.D. Of men and mitochondria: coping with hypoxia disoxia: The 1980
- J. Burns amberson secture // American rivien of respiratory disease. – 1980, Vol. 122, № 4. – P. 517.

**EFFECT OF THE «MURINE» TOXIN FROM YERSINIA PESTIS
ON THE ATP-ASE ACTIVITY IN EXRERIMENTAL ANIMALS**

V.S. Kagramanov, O.S. Bursha, L.E. Aseeva

*Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, Russia
(344002, Russia, Rostov-on-Don, M.Gorkogo's street, 117) plague@ic.ru*

Data are presented on the effect of the «murine» toxin (MT) form *Yersinia pestis* on the ATPase activity in cells of experimental animals. It has been shown that the data on the blood electrolyte contents, total ATPase activity and Na (+)-, K(+)-, Ca(++)-dependent ATPase activity induced by sublethal MT doses (0,5-1 mcg) indicate development of hypoxis state, specifically, metabolic acidosis in experimental animals.

Key words: plague, «murine» toxin, hypoxia, ATPase.