тварин: зниження на 41,17 % (P>0,05) для анальбену та на 40,27 % (P>0,05) — для піродозолу, але ці зміни статистично невірогідні.

Можна зробити висновок, що в умовах експериментального запалення («ад'ювантний» артрит) усім досліджуваним препаратам властива протизапальна активність, що доведено біохімічними показниками, а саме біомаркерами запальної реакції тканин суглоба — рівнями серомукоїдів і сіалових кислот.

За здатністю зменшувати за умов терапевтичного застосування збільшений рівень серомукоїдів і сіалових кислот досліджувані препарати можна розташувати так: диклофенак натрію > анальбен > целекоксиб > піродозол.

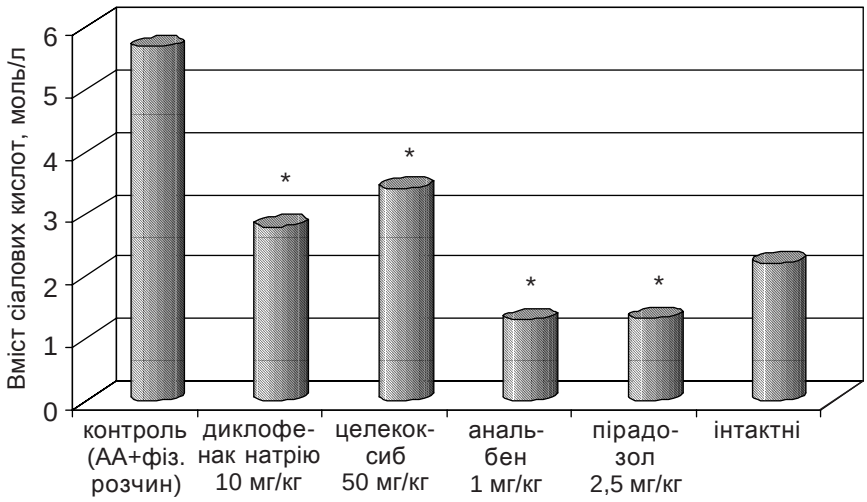

Рисунок. Зміни концентрації сіалових кислот у сироватці крові в процесі терапевтичного застосування досліджуваних препаратів в умовах «ад'ювантного» артриту

Примітка. * — P<0,05.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Клубова Г. Ф.* Ревматоїдний артрит: стан системного та локального імунітету на фоні застосування глюкокортикоїдів та базисної терапії // Укр. ревматол. журнал. — 2003. — № 1. — С. 45-50.

2. *Коваленко В. Н.* Ревматоидный артрит: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение // Ліки України. — 2005. — № 2. — С. 15-19.

3. *Подплетня Е. А., Мамчур В. И.* Механизмы гастродуоденотоксичности нестероидных противовоспалительных средств // Журнал АМН Украины. — 2005. — № 1. — С. 47-62.

4. *Доклінічні* дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації / За ред. О. В. Стефанова. — К.: Видав. дім «Авіценна», 2001. — С. 300-301.

5. *Макаренко О. В.* Анальгетична активність нового похідного норборнену в порівнянні з новим вітчизняним засобом // Тези VIII міжнародної науково-практичної конференції «Наука і освіта 2005». — Т. 26, Медицина. — С. 15-16.

6. *Макаренко О. В., Нефедов А. А., Каменская Л. А.* Центральный компонент в механизме болеутоляющего действия новых перспективных НПВС // Тези IV міжнародної науково-практичної конференції «Динаміка наукових досліджень — 2005». — Т. 30, Медицина. — С. 7-9.

7. *Науково-практичні* рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайретдинова. — К., 2002. — 155 с.

8. *Камышников С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. — Минск: Беларусь, 2000. — С. 64-66.

9. *Горячковский А. М.* Клиническая биохимия. — Одесса: Астропринт, 1998. — 584 с.

УДК 612.8+615.21

Т. І. Панова

ВПЛИВ КОМЕНОВОЇ КИСЛОТИ НА АКТИВНІСТЬ NA-, K-АТФ-ази З ПЛАЗМАТИЧНИХ НЕЙРОНАЛЬНИХ МЕМБРАН ЩУРА*

Донецький державний медичний університет ім. М. Горького

Вступ

Традиційним і достатньо вивченим механізмом опіоїдної рецепції є такий: ліганд + рецептор → активація G-білка → вторинний месенджер → активація протеїнкінази → активація (фосфорилування) ферменту → реакція клітини (зміни іонної проникності, біохімічні процеси, активація геному тощо).

У 1999 р. було заявлено про відкриття принципово нового шляху передачі сигналів від опіоїдного рецептора до повільних натрієвих каналів у мембрані сенсорного нейрона

* Робота виконана за кошти гранту Президента України № 34 на 2005 р.

[2; 4]. Альтернативний шлях не виключає традиційного, а існує разом із ним. Нестандартність щойно відкритого шляху полягає в тому, що здійснюється він, на думку авторів, без участі G-білків, але регулюється Na-, K-АТФ-азою; кінцевим пунктом цього шляху є не швидкі, а повільні тетродотоксиннечутливі (ТТХ) натрієві канали. Інакше кажучи, функцію посередника між опіоїдним рецептором і внутрішньою системою клітини виконує не G-білок, а натрій-калієва АТФ-аза. Це було встановлено методом "patch-clamp" за допомогою реєстрації ефективного заряду мембрани під дією на неї морфію. Як блокада (фрагментом GDPβS), так і активація (фрагментом GTPγS) інгібітора G-білка (коклюшного токсину) не змінювали впливу морфію на ефективний заряд мембрани, який вимірювався методом фіксації заряду повільних натрієвих каналів. І навпаки, введення уабаїну (інгібітора Na-, K-АТФ-ази) суттєво змінювало вплив морфію на ефективний заряд мембрани.

В окремому дослідженні було продемонстровано, що повільні натрієві канали сенсорних нейронів також задіяні у механізмі сприйняття клітиною ендогенних антибіотиків дефенсинів і піразинів [5]. При подальшому вивченні взаємодії повільних натрієвих каналів з іншими речовинами антибактеріальної дії було випадково встановлено, що коменова й меконова кислоти, які входять до складу антибактеріального та ранозагоювального лікарського препарату Баліз-2 [6], чинять на повільні натрієві канали вплив, подібний до впливу морфію (коменова кислота є похідним від меконової кислоти). Так, ці кислоти дозозалежно зменшували потенціалчутливість активаційного оборотного механізму повільних натрієвих каналів у мембрані сенсорного нейрона. Знайдений ефект усувався попереднім введенням у позаклітинний розчин як антагоніста опіоїдних рецепторів налтрексону, так і специфічного блокатора Na, K-АТФ-ази уабаїну [2].

На цій підставі зроблено припущення, що коменова кислота може виступати як модулятор щойно відкритого альтернативного шляху передачі сигналу від опіоїдного рецептора до повільних натрієвих каналів.

Виходячи з цих даних, **метою** цієї роботи було з'ясування здатності коменової кислоти впливати на активність натрій-калієвої АТФ-ази.

Матеріали та методи дослідження

Тканини спинного мозку і дорзальних гангліїв подрібнювали й гомогенізували на льоду в тефлоноскляному гомогенізаторі Даунса у 5-кратному об'ємі 20 мМ TPIC-HCl буфера (pH 7,3), який містив 250 мМ сахарози, по 1 мМ ЕГТА й ЕДТА, коктейль інгібіторів протеаз, 1 мМ ДДТ.

Гомогенат центрифугували 5 хв (350 g, 4 °C), потім до супернатанту додавали забуферений Перкол із 250 мМ сахарози до 40 %, нашаровували Перкол із різною концентрацією (30; 20; 10; 5; 0 %) і центрифугували 30 хв (10 000 g, 4 °C) [8]. При цьому мембрани розділялися на 5 фракцій між шарами з різною щільністю шляхом їх флотації в ступінчастому градієнті Перкола.

Після завершення центрифугування кожну фракцію окремо заморожували при -80 °C.

Оскільки Na-, K-АТФ-аза є визнаним маркером саме плазматичних мембран, фракції тестували на наявність у них Na-, K-АТФ-азної активності [1]. Тестування показало, що найбільшу питому активність (20–30 %) має 3-тя фракція, тому саме на препаратах цієї фракції проводили дослідження.

Для вивчення АТФ-азної активності аліквоти отриманих препаратів мембран розморожували та преінкубували 45 хв в інкубаційному буфері, який містив 120 мМ KCl, 25 мМ TPIC-HCl буфера (pH 7,3), по 1 мМ ЕГТА й ЕДТА, коктейль інгібіторів протеаз, 1мМ ДДТ, 2,5 мМ АДФ, 5 мМ NaN_3, 50 мкг/мл сапоніну при 4 °C в Thermomixer comfort (Eppendorf). В окремих випадках додавали 10 мкМ морфіну або 250 мкМ коменової кислоти.

Після преінкубування додавали ще буфер такого ж складу, але з міченим АТФ (250 000 розпадів на пробу) і 0,5 мМ немміченого АТФ — субстрату для натрій-калієвої АТФ-ази; також додавали 10 мМ NaCl (іони Na^+ активували Na, K-АТФ-азу).

Крім цього, в інкубаційну суміш вводили високоспецифічний інгібітор кальцієвої АТФ-ази саркоплазматичного ретикулума тапсигаргін (40 мкМ).

Реакцію інкубування проводили 30 хв при 37 °C в Thermomixer comfort (Eppendorf). Об'єм інкубаційної суміші — 100 мкл. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл зависі охолодженого активованого вугілля (виробництва Sigma, розмір комірок 100–400) в 50 мМ розчині одноосновного фосфату натрію. Завись осаджували центрифугуванням. Аліквоти супернатанту переносили в сцинтиляційну рідину й аналізували у сцинтиляційному лічильнику Rackbetta (Amersham).

Дані представлені у вигляді значень ферментативної активності (вивільнений із АТФ ортофосфат на 1 мг білка за 1 хв).

Об'єм проведених досліджень — 12 експериментів.

Коменова кислота надана нам групою вчених з Інституту фізіології ім. І. П. Павлова (Санкт-Петербург). Заявка на винахід № 2002107079/14 (007288). Дата пріоритету 19.03.2002. Росія.

Результати дослідження та їх обговорення

Тестування кожної з п'яти фракцій окремо щодо наявності в них Na-, K-АТФ-азної активності засвідчило, що найбільшу питому активність має третя фракція. Саме тому на препаратах цієї фракції було проведено подальші дослідження впливу морфію та коменової кислоти на Na-, K-АТФ-азну активність.

Вивчення активності Na-, K-АТФ-ази 3-ї фракції гомогенату спинного мозку показало, що коменова кислота у концентрації 250 мкМ не впливає на активність Na-, K-АТФ-ази. Вона не змінювалася також і під впливом морфіну.

За нашими даними, коменова кислота не впливає на активність натрій-калієвої АТФ-ази. Отже, наші дослідження не підтвердили гіпотезу, що коменова кислота може модулювати проходження сигналу від рецептора до ефекторів клітини через натрій-калієву АТФ-азу.

Згідно з даними наших попередніх досліджень, модулювальний ефект коменової кислоти на опіоїдні рецептори опосередковується G-білками [3].

Можна було б припустити, що негативний результат щодо впливу коменової кислоти на натрій-калієву АТФ-азу ми отримали тому, що не активували опіоїдні рецептори (адже коменова кислота не є лігандом опіоїдних рецепторів), тобто вивчали не весь шлях, запропонований Б. В. Криловим, А. В. Дербеньовим: «рецептор → натрій-калієва АТФ-аза → ефектор» [2; 4], а лише вибірково один фрагмент цього шляху: натрій-калієву АТФ-азу. Але для того, щоб виключити такий висновок, ми здійснили серію контрольних дослідів, у яких створювали умови для відтворення всього шляху повністю (якщо він дійсно існує): до фракції плазматичних мембран, у яких були й опіоїдні рецептори, додавали морфін — класичний ліганд цих рецепторів. І якби запропонована модель мембранної сигналізації була вірною, ми повинні були виявити наявність будь-якої залежності активності натрій-калієвої АТФ-ази від морфіну, але такої залежності не знайдено (рисунок).

Слід зазначити, що в літературі ми зустріли повідомлення, які не узгоджуються ні з гіпотезою Б. В. Крилова і А. В. Дербеньова, ні з нашими висновками. Так, W. Masocha і співавтори довели, що морфін впливає на активність уабаїн-залежної натрій-калієвої АТФ-ази (що не узгоджується з нашими даними), але шляхом активації μ-опіоїдних рецепторів і G-білків, тобто уабаїн-залежна натрій-калієва АТФ-аза все ж таки пов'язана з G-білками (це не узгоджується з гіпотезою Б. В. Крилова) [7].

Очевидно, ще зарано робити остаточні висновки. Для розв'язання цього питання потрібне використання різних методичних підходів.

Завершуючи обговорення отриманих даних, можна впевнено стверджувати: оскільки ані коменова кислота, ані морфін не впливали на активність Na-, K-АТФ-ази, то можна припустити, що цей фермент не є мішенню дії коменової кислоти і морфіну безпосередньо.

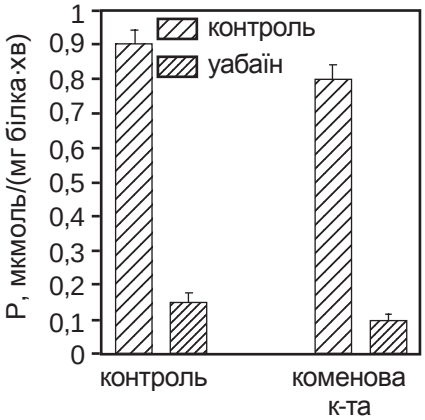

Рисунок. Вплив коменової кислоти на активність уабаїн-чутливої Na^+, K^+-АТФ-ази в плазматичних мембранах, отриманих із спинного мозку щура

Висновки

Коменова кислота і морфін не діють безпосередньо на Na, K-АТФ-азу з плазматичних мембран нейронів спинного мозку щура.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Дербенёв А. В.* Молекулярный механизм действия морфина, коменовой и меконовой кислот на медленные натриевые каналы сенсорных нейронов: Автореф. … канд. биол. наук: 03.00.13; 03.00.02 / Ин-т физиол. им. И. П. Павлова РАН. — СПб., 1999. — 17 с.

2. *Морфин* уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов / Б. В. Крылов, А. В. Дербенёв, С. А. Подзорова и др. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 1999. — Т. 85, № 2. — С. 225-236.

3. *Плахова В. Б.* Механизмы взаимодействия дефенсинов и пиразинов с медленными натриевыми каналами сенсорных нейронов: Автореф. … канд. биол. наук: 03.00.13 / Ин-т физиол. им. И. П. Павлова РАН. — СПб., 2000. — 16 с.

4. *Шурыгин А. Я.* Препарат бализ. — Краснодар, 2002.

5. *Percoll.* Methodology and applications. — Amersham Bioscience, 2001. — 84 p.

6. *Биологические* мембраны: Методы / Под ред. Дж. Б. Финдлея, У. Г. Эванза. — М.: Мир, 1990. — 424 с.

7. *Влияние* коменовой кислоты на активацию G-белков агонистами опиатных рецепторов в плазматических мембранах из мозга крысы / В. Н. Казаков, Т. И. Панова, В. Н. Цывкин, И. М. Прудников // Нейрофизиология / Neurophysiology. — 2004. — Т. 36, № 1. — С. 13-19.

8. *Mechanisms* involved in morphine-induced activation of synaptosomal Na^+, K^+-ATP-ase / W. Masocha, L. G. Gonzalez, J. M. Baeyens, A. Agil // Brain Res. — 2002. — Vol. 957, N 2. — P. 311-319.