

С. В. Яблонская, Г. В. Островская, Т. В. Рыбальченко,
Е. М. Филинская, В. К. Рыбальченко

Влияние гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, сукцината натрия и их совместного применения на Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную активность плазматической мембраны гепатоцитов

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Н. Ю. Евтушенко)

One of the biochemical mechanisms of action of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is its influence on the Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase activity of hepatocytes plasma membrane after the subchronic introducing into rats (1/40 LD_{50}) and in vitro (10^{-9} – 10^{-4} mol/l). Sodium succinate is less active in relation to this enzyme, however it is capable to oppress 2,4-D effects. It can be considered as protective properties of sodium succinate.

Интоксикация организма человека ксенобиотиками — один из главных вопросов современной науки. В сельском хозяйстве широко используются гербициды на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), которые проявляют канцерогенный, мутагенный и нейротоксический эффекты на организм человека и животных [1]. Основным органом биологической трансформации токсических веществ является печень, которая первой подвергается их вредному влиянию. Одним из показателей состояния органов при действии различных факторов могут служить изменения активности мембраносвязанных ферментов, например Mg^{2+} -зависимой Ca^{2+} -активируемой АТФазы плазматической мембраны (ПМ), осуществляющей активный транспорт ионов Ca^{2+} и через изменение внутриклеточной концентрации катиона в значительной степени обеспечивающей жизнедеятельность всей клетки в целом [2, 3]. В клинической практике при лечении ряда заболеваний, в том числе и при поражениях печени, используется сукцинат, который проявляет защитные свойства [4].

Авторами настоящего сообщения изучено субхроническое и непосредственное (*in vitro*, в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-4} моль/л) влияние гербицида 2,4-Д, сукцината натрия, а также их совместное влияние на Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную активность ПМ гепатоцитов крыс.

Субхронический эффект 2,4-Д, сукцината натрия и их совместного применения исследован на 60 крысах-самцах (линии Вистар). Вещества вводили животным ежедневно в объеме 1 мл интрагастрально (с помощью зонда до кормления) в течение четырех недель. Контрольная группа животных (№ 1) получала 1 мл H_2O (дист.), три экспериментальные группы — растворы исследуемых веществ в том же объеме: группа № 2 — 2,4-Д (10 мг/кг массы), № 3 — сукцинат натрия (25 мг/кг), что примерно соответствует терапевтическим дозам различных соединений сукцината, № 4 — 2,4-Д (10 мг/кг) + сукцинат натрия (25 мг/кг). Исследования действия веществ *in vitro* (в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-4} моль/л) проведены на фракциях ПМ гепатоцитов 20 интактных крыс-самцов. ПМ гепатоцитов выделяли методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы [5]. Белок ПМ определяли методом Lowry [6], Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную активность — по разности между АТФазной

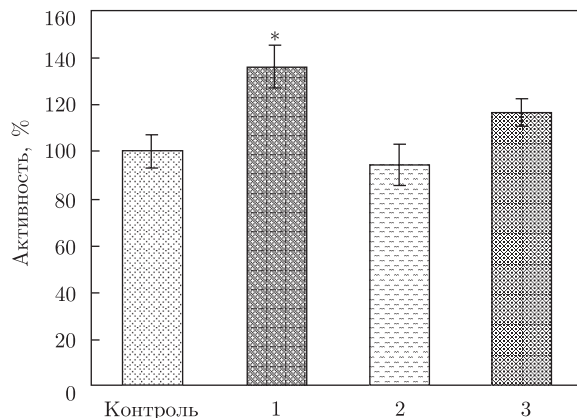


Рис. 1. Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазная активность фракции ПМ клеток печени крыс после субхронического воздействия гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (10 мг/кг) и сукцината натрия (25 мк/кг): 1 — 2,4-Д; 2 — сукцинат Na; 3 — 2,4-Д + сукцинат Na. * — $p < 0,01$ относительно контроля

активностью в присутствии 10 мкмоль/л $CaCl_2$ и без него. Среда исследования: фракция ПМ в количестве 20 мкг по белку, 30 мкмоль/л ЭГТА, 50 ммоль/л *трис*-HCl, 70 ммоль/л KCl и 3 ммоль/л Mg-АТФ, pH 7,5, температура 37 °С. Ферментативную активность определяли по количеству неорганического фосфата (Φ_n), выделившегося в результате реакции, методом Rathbun и Betlach [7].

Установлено, что Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазная активность ПМ клеток печени крыс контрольной группы составляет $(25,5 \pm 1,8)$ нмоль Φ_n /мин · мг белка. После субхронического воздействия 2,4-Д на животных ферментативная активность превышает контрольный показатель на 36% ($p < 0,01$) (рис. 1). Такое изменение Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазной активности — одно из проявлений токсического воздействия 2,4-Д на субклеточном уровне и может быть как следствием его непосредственного влияния на молекулу фермента, так и следствием ряда опосредованных путей действия 2,4-Д на субклеточные структуры в организме. Поэтому мы провели изучение непосредственного действия гербицида на Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазную активность ПМ *in vitro*.

Установлена выраженная параболическая зависимость Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазной активности ПМ от концентрации 2,4-Д (рис. 2). Так, в концентрациях 2,4-Д 10^{-9} – 10^{-4} моль/л отмечается достоверное угнетение ферментативной активности на 50% по сравнению с контрольными значениями ($(25,4 \pm 2,1)$ нмоль Φ_n /мин · мг белка). При концентрации гербицида 10^{-8} – 10^{-5} моль/л угнетение активности фермента менее выражено (на 26 и 17% соответственно, $p < 0,5$). Микромолярная концентрация не вызывает существенных изменений АТФазной активности.

Необычный характер изменения Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазной активности под влиянием 2,4-Д можно объяснить мембранотропными свойствами этого ксенобиотика. Как показано нами в исследованиях на модельных моно- и билипидных мембранах [8, 9], 2,4-Д проявляет незначительную, но имеющую двухфазный характер, мембранотропную активность. В низких концентрациях отрицательно заряженные молекулы 2,4-Д взаимодействуют с полярными головками липидного матрикса и адсорбируются на его поверхности. При концентрации гербицида 10^{-6} моль/л и выше процесс взаимодействия с мембраной активируется и происходит встраивание молекул 2,4-Д в гидрофобную зону мембраны, что может вызывать дезорганизацию упаковки ее липидов. Молекула Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазы — это полипептидная

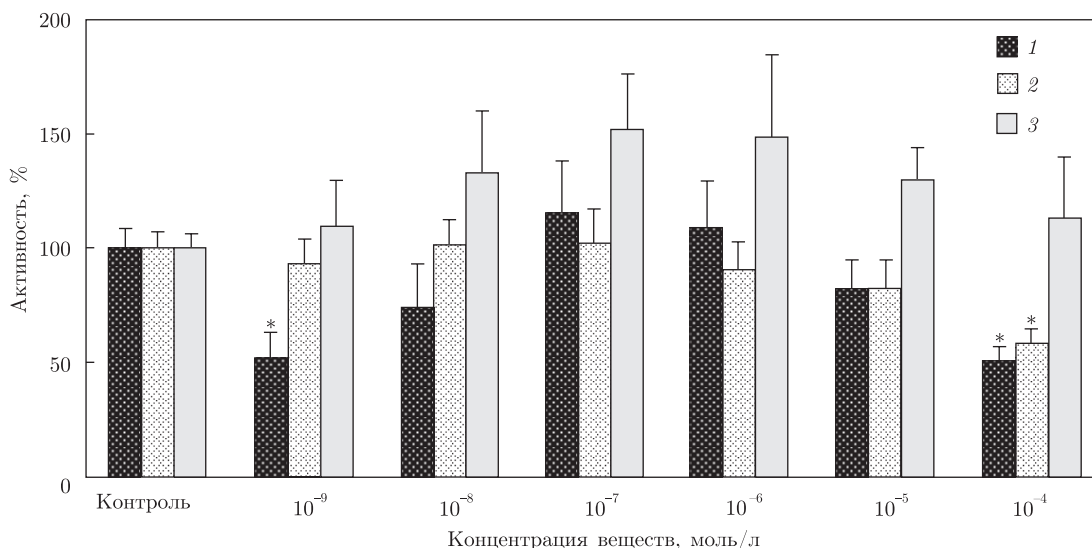


Рис. 2. Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазная активность фракции ПМ клеток печени крыс под влиянием 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и сукцината натрия в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-4} моль/л: 1 – 2,4-Д; 2 – сукцинат Na; 3 – 2,4-Д + сукцинат Na. * – $p < 0,01$ относительно контроля

трансмембранная цепь, 10 раз пересекающая мембрану и имеющая внемембранные петли, при этом активность фермента значительно зависит от зарядов гидрофильных головок окружающих липидов [2]. Поэтому при низких концентрациях отрицательно заряженные молекулы гербицида, адсорбируясь на поверхности мембраны, могут непосредственно влиять на внеклеточные домены молекулы фермента, изменяя его активность. Проникая при больших концентрациях в мембрану, гербицид может способствовать угнетению ферментативной активности как путем воздействия на уровень текучести мембранных липидов, так и путем непосредственного взаимодействия с внутримембранными доменами фермента. Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФаза имеет определенный оптимум текучести липидного матрикса [2], при котором она может полностью реализовать свою функциональную активность, тогда как изменение лабильности матрикса в ту или иную сторону приводит к нарушению активности фермента.

Субхроническое влияние сукцината натрия, в отличие от 2,4-Д, не вызывает существенных изменений Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазной активности ПМ (см. рис. 1). При совместном применении сукцината натрия и гербицида 2,4-Д наблюдается тенденция к увеличению ферментативной активности (на 16%, $p < 0,1$, относительно контрольных значений), что на 20% меньше по сравнению с влиянием 2,4-Д (см. рис. 1). Таким образом, сукцинат натрия в определенной степени нивелирует активирующий эффект 2,4-Д на Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазную активность, что совпадает с результатами наших гистологических исследований [10] и может служить доказательством протективных свойств сукцината по отношению к ПМ при действии гербицида.

В исследованиях *in vitro* установлено, что под влиянием сукцината натрия в диапазоне концентраций 10^{-9} – 10^{-6} моль/л Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазная активность ПМ существенно не изменяется (см. рис. 2), тогда как более высокие концентрации сукцината натрия вызывают постепенное снижение активности. Под влиянием 10^{-4} моль/л сукцината происходит почти двукратное угнетение Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазной активности ($p < 0,01$) по сравнению

с контрольными значениями. Это снижение ферментативной активности свидетельствует о проявлении токсических эффектов высоких концентраций сукцината. Действие сукцината натрия совместно с 2,4-Д *in vitro* вызывает изменения Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазной активности ПМ, которые также имеют параболический характер, однако они обусловлены возрастанием ферментативной активности и менее выражены, чем в случае индивидуального применения 2,4-Д (см. рис. 2). Так, при концентрациях веществ 10^{-9} – 10^{-4} моль/л Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазная активность не изменяется. При концентрациях сукцината и 2,4-Д 10^{-8} – 10^{-5} моль/л наблюдается увеличение ферментативной активности на 33% ($p < 0,5$) и 30% ($p < 0,1$), соответственно. Под влиянием исследуемых веществ в концентрациях 10^{-7} – 10^{-6} моль/л активность фермента уже превышает контрольные значения на 52 и 47% ($p < 0,1$) соответственно.

Таким образом, одним из биохимических механизмов цитотоксического действия гербицида 2,4-Д является его влияние на Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную активность ПМ гепатоцитов, что проявляется в активации фермента после субхронического влияния ксенобиотика и в разнонаправленных изменениях активности фермента под влиянием непосредственного действия гербицида на ПМ в разных концентрациях. Сукцинат натрия, проявляя некоторое негативное действие при высоких концентрациях *in vitro*, частично нивелирует эффекты гербицида *in vivo*. Хотя сукцинат натрия при совместном использовании с 2,4-Д значительно модулирует непосредственное влияние гербицида на Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазную активность, однако отмечается взаимодействие эффектов этих двух регуляторов, на что указывает параболическая концентрационная зависимость, характерная для влияния 2,4-Д.

1. Bradberry S. M., Watt B. E., Proudfoot A. T., Vale J. A. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review // J. Toxicol. Clin. Toxicol. – 2000. – 38, No 2. – P. 111–122.
2. Пестов Н. Б., Дмитриев Р. И., Шахпаронов М. И. Регуляция Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран // Успехи биол. химии. – 2003. – 43. – С. 99–138.
3. Рыбальченко В. К. Ca^{2+} -насос в миоцитах тонкого кишечника // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1991. – 110, № 4. – С. 376–377.
4. Коваленко А., Белякова Н., Романцов М. и др. Фармакологическая активность янтарной кислоты и ее лекарственные формы // Врач. – 2000. – № 4. – С. 26–27.
5. Song C., Rubin W., Rifkind A., Kappas A. 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.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, No 1. – P. 265–275.
7. Rathbun W. B., Bettlach M. V. Estimation of enzymatically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate // Anal. Biochem. – 1969. – 28. – P. 436.
8. Ostrowska G., Rybalchenko V., Rybalchenko T., Filinska O. Decrease of hepatotoxic effect of herbicide 2, 4-D by plant growth regulator Ivin // Ann. Univ. Maria Curie-Sklodowska. Sectio DDD. Pharmacia. – Lublin: Wschod, 2002. – Vol. 15. – P. 425–428. (Poland).
9. Бичко А. В., Рыбальченко В. К. Модифікація рідинно-кристалічної структури біомолекулярних мембран N-оксид-2,4-лутидином (Івіном) // Фізика живого. – 2002. – № 1. – С. 39–43.
10. Карпезо Н. О., Гурняк О. М., Цивінська С. М. та ін. Гепатопротекторні властивості сукцинату натрію за умов отруєння гербіцидом 2,4-Д // Соврем. пробл. токсикологии. – 2005. – № 2. – С. 86–90.

Киевский национальный университет
им. Тараса Шевченко

Поступило в редакцию 13.11.2007