

АКТИВНІСТЬ 5'-НУКЛЕОТИДАЗИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КЛІТИН РІЗНИХ ОРГАНІВ ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ

*В. О. Чайка¹, О. І. Харченко¹, О. І. Долішняк², Л. І. Богун¹,
В. В. Сторожук¹*

1 – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра біохімії, НДІ «Фізико-хімічної біології», e-mail.: rigik1979@mail.ru

2 – Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Коломийський інститут, e-mail.: oksanamchk@ukr.net

Досліджено активність 5'-нуклеотидази плазматичних мембран гепатоцитів та клітин мозку щурів при дії етанолу. Встановлено її різке зростання протягом всього періоду експерименту. Показано, що введення оцтовокислого цинку приводить до нормалізації активності досліджуваного ферменту плазматичних мембран гепатоцитів та клітин мозку щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, оцтовокислий цинк, плазматичні мембрани, мембранозв'язані ферменти.

Chayka V.O., Kharchenko O.I., Dolishniak O. I., Bogun L. I., Storozhuk V. V. 5'-nucleotidase activity of plasmatic membrane of different organs cell of rats by chronic alcohol intoxication with introduction of vinegar zinc. There was explored 5'-nucleotidase activity of plasmatic membrane of hepatocytes an neurons of rats by ethanol action. Sharp growth was installed to this activities on length of the whole period of the experiment. There was shown that entering the vinegar zinc brings about normalizations of the activities this ferment of plasmatic membranes of hepatocytes and cells of the brain of the rats at condition chronic alcoholic intoxication.

Key words: alcohol intoxication, vinegar zinc, plasmatic membranes, membrane ferments.

Вступ

Біологічні мембрани належать до числа головних структурних елементів клітини, відповідальних за її цілісність [1]. Однією з характеристик та важливих функцій біологічних мембран є селективна проникність для різноманітних речовин, що забезпечує компартменталізацію та цілісність метаболічних процесів у клітині. Кардинальні клітинні процеси, такі як поділ, клітинна взаємодія, адаптивні зміни, біоенергетичні процеси, пов'язані зі структурно-функціональним станом мембран, який визначається сукупністю ендо- та екзогенних чинників [2, 3].

При алкоголізмі спостерігаються структурні зміни плазматичних мембран різних клітин. При тривалому впливі етанолу змінюється проникність клітинних мембран [1, 4]; зміни спостерігаються в плазматичних мембранах різного походження, субклітинних мембранах, у тому числі синаптосомальних і мітохондріальних, ліпосомах та інших модельних мембранах [4, 5].

Результати експериментальних та клінічних досліджень дозволяють обґрунтовано говорити про те, що для розуміння молекулярних основ дії етанолу і шляхів розвитку толерантності живих організмів до його дії необхідно зрозуміти механізм впливу етанолу на ліпіди мембран.

Сьогодні вважається, що етанол здатний впливати на ліпіди як безпосередньо, так і через вплив на процеси їх моделювання (взаємоперетворення та синтезу), синтез ліпідних медіаторів (тромбоцит-активуєчий фактор, простаноїди) та ліпід-опосередковані сигнальні шляхи.

Показано, що середні та високі дози етанолу значно підвищують текучість ліпідів клітинних мембран [4, 6, 7]. У сучасних роботах встановлено, що високі концентрації етанолу здатні призвести до порушення двошарової структури плазматичної мембрани шляхом утворення структур, які нагадують інвертовані міцели. У межах зазначених структур змішуються ліпіди з протилежних шарів мембрани, що призводить до її незворотніх пошкоджень [7, 8, 9].

На сьогоднішній день відсутні системні дослідження ліпідного складу плазматичних мембран багатьох органів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. Дослідження цього показника при формуванні даної патології є важливим не лише для оцінки їх структурно-функціонального стану, а і для з'ясування біохімічних механізмів їх корекції.

Дослідженнями останніх років доведено, що стаціонарний рівень перекисів ліпідів у нормально метаболізуючих тканинах зумовлений збалансованістю функціонування систем їх генерації та утилізації, тобто взаємопов'язаним функціонуванням ВРО, зокрема ПОЛ, та ендогенних антиоксидантів [2, 6, 10]. Існують дані, що ефекти етанолу зумовлені його взаємодією зі специфічними рецептивними полями клітинних мембран [11]. На сьогодні немає однозначної відповіді щодо впливу етанолу на функціонування основних мембранозв'язаних ферментів, зокрема 5'-АМФази, яка як маркер ферментів, зв'язаних із зовнішньою поверхнею мембран клітин, використовується для визначення перебігу численних патологічних станів організму. Визначення змін у

функціонуванні зазначеного ензиму плазматичних мембран гепатоцитів та клітин мозку дозволить краще зрозуміти біохімічний механізм тривалого впливу етанолу на життєдіяльність цих клітин та оцінити можливий протекторний ефект іонів цинку. Тому метою нашої роботи було визначити вплив оцтовокислого цинку на активність 5'-АМФази в плазматичних мембранах гепатоцитів та клітинах мозку щурів в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

Матеріали і методи

В дослідях використовували білих щурів лінії Вістар обох статей масою 180-220 г. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. Експериментальна алкогольна інтоксикація викликала за методикою М.Х. Халілова та Ш. А. Закірходжаєва: 40° етиловий спирт вводився перорально з розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини раз на добу протягом 21 днів [12]. Дослідження проводили на 4, 6, 11, 16 та 21 добу після початку експерименту. Гепатоцити отримували в 1 % розчині тритону X-100 у співвідношенні тканина : розчин 1 : 3 за методикою [13] на 4, 6, 11, 16 та 21 добу після початку експерименту.

Осад плазматичних мембран ресуспендували в середовищі гомогенізації, нашаровували в центрифужних пробірках поверх рівного об'єму 26%-ної сахарози та центрифугували при 102000g протягом 60 хв. Плазматичні мембрани концентрувались на межі суспензії-сахароза [14]. Одержаний супернатант використовували для визначення активності досліджуваного ферменту.

5'-АМФаза (5'-нуклеотидаза) гідролізує аденозин-5'-монофосфат з утворенням фосфорної кислоти. Активний центр ферменту розташований на зовнішній поверхні мембрани. Принцип методу полягає у визначенні кількості Фн, що утворюється у результаті гідролізу аденозин-5'-монофосфату (АМФ) [15]. Після проведення реакції проби аналізували на наявність Фн з застосуванням методу Фіске-Суббароу [16]. Для цього у всі проби наливали 0,5 мл 2,5% молібдата аммонію, який був приготовлений в розчині 5 Н H₂SO₄, 0,5 мл 2% розчину аскорбінової кислоти і 1 мл бідистильованої води. Проби інкубували 30 хв (для оптимального пофарбування), потім центрифугували 10 хв. при 200g (для осадження білку). Екстинкцію супернатанту вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 680 нм проти контролю. Кількість фосфату визначали за стандартною кривою. Експериментальні дані оброблялись загальноприйнятими методами варіаційної статистики [17]. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стюдента (t).

Результати і обговорення

5'-нуклеотидаза (5'-АМФаза) (5'-рибонуклеотид фосфогідролаза, КФ 3.1.3.5) слугує загальновідомим маркером запальних процесів, тому зміни її активності дозволяють судити про перебіг численних патологічних станів організму. Зокрема, зміни активності даного ферменту використовуються як діагностичний та прогностичний тест при захворюваннях шлунково-кишкового тракту [18].

При дослідженні активності 5'-нуклеотидази плазматичних мембран гепатоцитів щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації нами було встановлено її різке зростання протягом всього періоду експерименту в 4, 6 та 7 разів у порівнянні з контролем на 4-ту, 7-му та 11-ту доби, відповідно. На 21-шу добу активність 5'-нуклеотидази була найвищою – майже в 13 разів більшою відносно контрольних показників (рис. 1).

При введенні оцтовокислого цинку за дії етанолу в гепатоцитах щурів також спостерігалось зростання активності даного ферменту в 2 рази на 4-ту, 7-му та 11-ту доби в порівнянні з контролем. На 16-ту та 21-шу доби активність 5'-нуклеотидази значно зростала: в 6 і 7,3 рази відповідно. Однак, в порівнянні з відповідними строками експерименту за умов хронічної алкогольної інтоксикації активність 5'-нуклеотидази була значно нижчою: в 2 рази на 4-ту і 21-шу доби й у 3 рази на 7-му та 11-ту доби дослідження (рис. 1).

При дослідженні дії етанолу на активність 5'-нуклеотидази плазматичних мембран клітин мозку щурів нами було встановлено її зростання протягом всього періоду експерименту: на 4-ту (в 3 рази), 7-му (в 2 рази) та 16-ту доби (в 2,3 рази), відповідно, в порівнянні з контролем. На 21-шу добу експерименту зростання активності 5'-нуклеотидази було найвищим – у 4,5 рази більшим у порівнянні з контролем (рис. 2).

Введення оцтовокислого цинку за умов хронічної алкогольної інтоксикації також призводило до зростання активності досліджуваного ферменту плазматичних мембран клітин мозку щурів на всіх етапах дослідження й перевищувала контрольні показники в 2,5; 1,8 та 3,5 разів на 4-ту, 7-му та 21-шу доби, відповідно. У порівнянні з відповідними етапами за умов алкогольної інтоксикації на 4-ту, 11-ту та 21-шу доби активність даного ензиму була, відповідно, в 1,2; 1,4 та 1,3 рази нижчою.

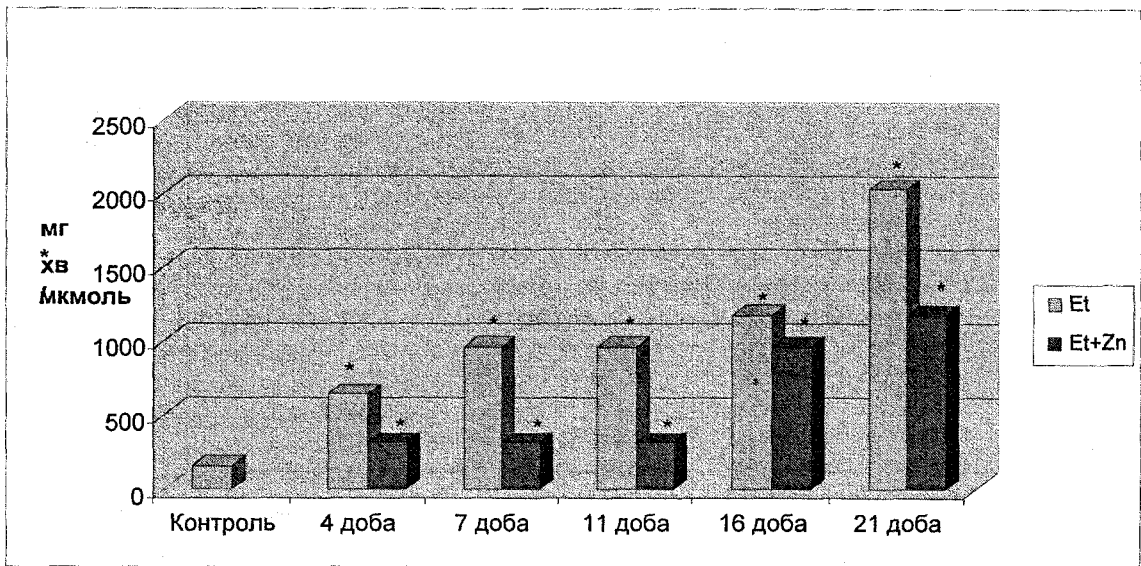


Рис. 1. Активність 5'-нуклеотидази плазматичних мембран гепатоцитів щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

(* P ≤ 0,05 у порівнянні з контролем)

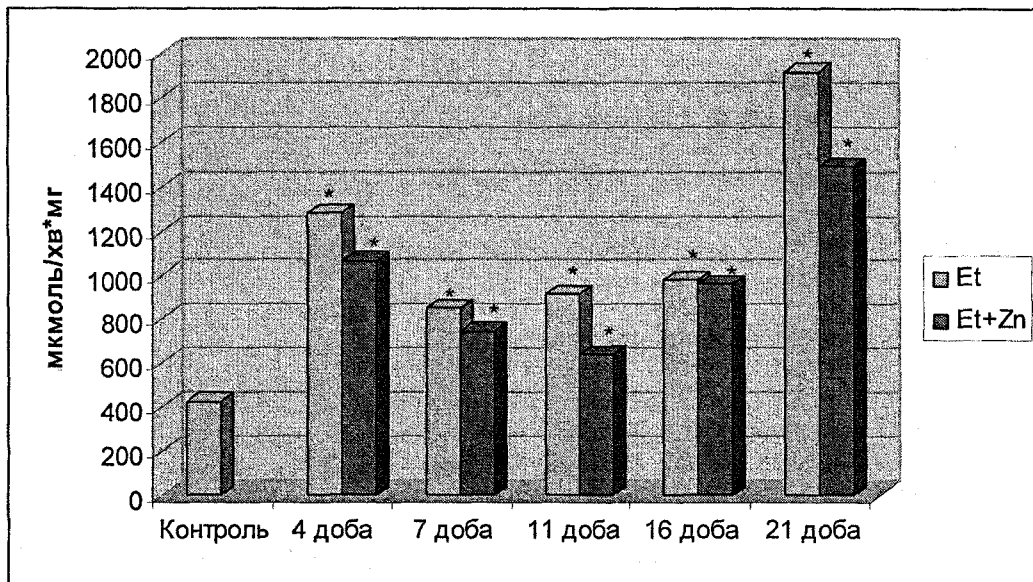


Рис. 2. Активність 5'-нуклеотидази плазматичних мембран клітин мозку щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

(* P ≤ 0,05 у порівнянні з контролем)

5'-нуклеотидаза є субстратспецифічною фосфогідролазою, яка виявлена в мембранах клітин багатьох тканин (серця, шлунка, печінки, нирок, легень, мозку, м'язів, кишечника та ін). Мембранна форма 5'-АМФази (ектоензим) розміщується з зовнішнього боку плазматичних мембран та використовується як маркер ферментів, зв'язаних із зовнішньою поверхнею мембран клітин. Фермент прикріплений до поверхні мембрани глікозилфосфатидилінозитним залишком, який посттранскрипційно приєднується до Ser-523 амінокислотної послідовності під час процесінгу у ендоплазматичному ретикулумі [26, 27]. Мембранна форма 5'-нуклеотидази є інтегральним білком плазматичної мембрани, тому здатна взаємодіяти з фосфатидилінозитом та актином у формі нуклеазного комплексу [19].

Зв'язана з мембранами 5'-АМФаза гідролізує нуклеозидфосфати та дезоксинуклеозидфосфати виключно як 5'-монофосфати, не проявляючи активності (чи дуже низьку) з 2'- чи 3'-монофосфатами [20]. Встановлено, що активність ферменту повністю залежить від присутності Mg^{2+} . Ця форма 5'-АМФази містить структурований іон Zn^{2+} , що, можливо, відіграє роль у стабілізації інтегральної 5'-АМФази у мембрані. 5'-нуклеотидаза під дією фосфоліпаз може вивільнюватися з мембран у цитозоль.

Продукт 5'-нуклеотидази аденозин – потужний ендогенний регулятор репарації тканин, який виходить з травмованих клітин і тканин. Аденозин може сформуватися внутрішньоклітинно й потім бути транспортованим у позаклітинне середовище, або може синтезуватися екстрацелюлярно з нуклеотидів аденіну, що виходять з

травмованих клітин. Аденозин, що синтезується екстрацелюлярно з аденінових нуклеотидів, відіграє головну роль в патогенезі фіброзів печінки, тому інгібування його синтезу або блокада аденозинових рецепторів можуть попередити розвиток фіброзів печінки [21].

Встановлені нами зміни активності ферменту при хронічній алкогольній інтоксикації узгоджуються з результатами інших авторів. В експериментах *in vitro* показано, що за умов гострого та хронічного впливу етанолу відбувається зростання активності 5'-нуклеотидази тромбоцитів [22, 23]. У експериментах на мишах показано, що при введенні етанолу зростання синтезу аденозину, яке супроводжується активацією аденозинових рецепторів, призводить до розвитку жирової дистрофії печінки [22].

У експериментах на щурах, які щоденно споживали етанол (3,5 г/кг перорально протягом 7 днів) було показано зростання активності ацетил-СоА-синтетази й 5'-нуклеотидази мозку, що супроводжувалось збільшенням вмісту ацетату в головному мозку й аденозину в корі головного мозку [24].

Встановлені нами зміни активності 5'-нуклеотидази можуть бути пов'язаними із пошкодженням структури мембрани парієтальних клітин, на що вказують попередньо встановлені нами зміни в її фосфоліпідному складі та вмісті продуктів ПОЛ. Нормалізація активності ферменту при введенні оцтовокислого цинку може бути пов'язаною із позитивними змінами зазначених показників, що було показано у попередніх дослідженнях. Окрім того, при дослідженні певних патологій було встановлено, що існує залежність між вмістом цинку, активністю зазначеного ферменту та вмістом МДА – одного з основних продуктів ПОЛ [25].

Висновки

Отже, хронічна алкогольна інтоксикація призводить до зростання активності 5'-нуклеотидази плазматичних мембран гепатоцитів та клітин мозку щурів. Введення оцтовокислого цинку сприяє нормалізації активності досліджуваного ферменту плазматичних мембран клітин різних органів щурів за умов впливу етанолу.

Література

1. Музыка В. И., Веймер С. А., Троицкий И. Н. Изменения показателей проницаемости клеточных мембран при действии этанола на организм человека // Вопросы наркологии. – 1991. – № 4. – С. 4– 6.
2. Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. – 1985. – Т. 54. – № 9. – С. 1540–1558.
3. Груздева К. Н., Высокогорский В. Е. Роль этанола как дестабилизатора субклеточных мембран и метаболических реакций в процессе развития алкогольной зависимости // Биологические основы алкоголизма. – М., 1984. – С. 59–64.
4. Божко Г. Х., Волошин П. В. Этанол и биосинтез белков в печени животных // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36. – № 4. – С. 2–6.
5. Селевич М. И., Лелевич В. В. Липидный состав тканей крыс при хронической алкогольной интоксикации и инкорпоральном поступлении радионуклеидов // Здравоохранение. – Мн., 1997. – № 6. – С. 18–20.
6. Дереча Л. М. Алкоголь та його дія на організм: огляд літератури // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2007. - Вип.6, № 7. – С. 88.
7. Сторожок С. А., Панченко Л. Ф., Филипович Ю. Д., Глушков В. С. Изменения физико – химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу // ТМГА, Тюмень. – 2000. № 4. – 162 с.
8. Селевич М. И. Особенности метаболизма липидов у крыс, предпочитательно потребляющих воду или этанол: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Гродно, 1982. – 157 с.
9. Гринштейн С. В., Кост О. А. Структурно-функциональные особенности мембранных белков // Успехи биологической химии. – 2001. - т.41. - с. 77 - 104.
10. Кения М. В., Лукаш А. И., Гуськов Е. П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113. – Вып. 3. – С. 456–470.
11. Tabakoff V., Hoffman P. L. Biochemical pharmacology of alcohol // Psychopharmacology: The third generation of progress / Ed. by H.Y.Meltzer. – N.Y.: Raven Press, 1987. – P. 1521–1526.
12. Халилов М. Х., Закиходжаев Ш. Я. К характеристикам некоторых патохимических сдвигов крови, в тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации // Вопросы клиники алкоголизма: сб. науч. тр. - Ташкент 1983. - С. 28 – 41.
13. Хакадзе Г. А., Коноплицкая К. Л., Познякова Т. Л. и др. // Укр. Биохим. Журнал, - 1987. – Т59, №4. – С. 25 – 29.
14. Древаль В. И., Финаин А. В., Баранник Е. А. // Укр.биохим.журн. – 1989. – Т 61, №2. – С. 129 – 134.
15. Рибальченко В. К., Коганов М. М. Структура і функції мембран. Практикум. - К.,1988. – 320 с.
16. Fiske C. H., Subbarow I. J. The colometric determination of phosphorus // J. Biol. chem. – 1925. – V.66, №1. – P. 375-400.
17. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений. – М.: Мир, 1975. – 312с.
18. Глуценко Н. Н. Изменение содержания природных антиоксидантов и активности антиоксидантных ферментов при введении цинка / Глуценко Н. Н., Богословская О. А., Ольховская И. П. // V Международная конференция "Биоантиоксидант": Тез. докл. – Москва, 1998. – С. 113.
19. Takeuchi A. 5'-nucleotidase / Takeuchi A., Shibuya A. // Nippon. Rinsho. – 2004. – V.62. – P.492-494.

20. Mechanistic studies on bovine cytosolic 5'-nucleotidase II, an enzyme belonging to the HAD superfamily / *Allegrini S., Scaloni A., Careddu M. G. et al.* // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – V. 271, №23–24. – P. 4881–4891.
21. *Peng Z., Fernandez P., Wilder T., Yee H., Chiriboga L., Chan E.S., Cronstein B.N.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis // *FASEB J.* – 2008. – V. 22, № 7. – P. 2263-2272.
22. *Peng Z., Borea P.A., Varani K., Wilder T., Yee H., Chiriboga L., Blackburn M.R., Azzena G., Resta G., Cronstein B.N.* Adenosine signaling contributes to ethanol-induced fatty liver in mice // *J. Clin. Invest.* – 2009. – V. 119, № 3. – P. 582-594.
23. *Dias G.R., Schetinger M.R., Spanevello R., Mazzanti C.M., Schmatz R., Loro V.L., Morsch V.M.* Hormetic acute response and chronic effect of ethanol on adenine nucleotide hydrolysis in rat platelets // *Arch Toxicol.* – 2009. – V. 83, № 3. – P. 263-269.
24. Acetate metabolism in brain mechanisms of adaptation to ethanol / *Kiselevski Y., Oganessian N., Zimatkin S. et al.* // *Med Sci Monit.* – 2003. – V. 9, №5. – P. 178–182.
25. *Пукуза О. И.* Взаимосвязь цинкового статуса и показателей мембранолиза у детей и подростков с острой пневмонией / *Пукуза О. И., Закирова А. М.* // *Педиатрия.* – 2006. – №3. – С. 7–10.
26. *Misumi Y., Ogata S., Hicose S., Ikehara Y.* Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid // *J. Biol. Chem.* – 1990. – N 265 (4). – P. 2178 – 2183.
27. *Misumi Y., Ogata S., Ohkubo K., Hirose S., Ikehara Y.* Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form // *Uer. J. Biochem.* – 1990. – N 191 (3). – P. 563 – 569.

Стаття поступила до редакції 17.12.2010 р.; Стаття прийнята до друку 30.12.2010 р.

Чайка В. О. – канд. біол. наук, м.н.с., асистент кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Богун Л.І. – канд. біол. наук, наук. співробітник кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Харченко О.І. – канд. біол. наук, м.н.с. кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Долішняк О.І. – канд. біол. наук, доцент кафедри Коломийського інституту Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Сторожук В.В. – студент кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Рецензент: кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу біохімії НДІ фізіології імені академіка П. Богача біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка Дворченко К. О.