

УДК 616.89-008.441.13-036

## АКТИВНІСТЬ 2',5'-ОЛІГОАДЕНІЛАТ-СИНТЕТАЗИ В ЛІМФОЦИТАХ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ЕТАНОЛЬНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА ВВЕДЕННІ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ

В. О. ЧАЙКА, І. В. КОМПАНЕЦЬ, О. П. ГАДІЛІЯ,  
О. І. ХАРЧЕНКО, Л. І. ОСТАПЧЕНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;  
e-mail: rigik1979@mail.ru

*Встановлено, що в умовах хронічної алкогольної інтоксикації в лімфоцитах селезінки щурів пригнічується активність інтерферон-індукованого ензиму – 2',5'-олігоаденілат-синтетази. Введення щурам оцтовокислого цинку сумісно з етанолом викликає підвищення активності досліджуваного ензиму, з найбільш вираженим ефектом на пізніх етапах розвитку алкогольної інтоксикації.*

*Ключові слова: лімфоїдні клітини, хронічна алкогольна інтоксикація, оцтовокислий цинк, 2',5'-олігоаденілат-синтетаза.*

Алкоголізм є однією з найактуальніших проблем, пов'язаних із здоров'ям людини, які постають сьогодні перед сучасним суспільством. В основі формування алкогольної залежності лежать порушення біохімічних процесів у клітині, зокрема, дестабілізація структури мембран, дисбаланс у ензимних каскадах, зміни вуглеводного й енергетичного обміну [1]. На рівні організму це призводить до зміни діяльності нейрогуморальної та ендокринної систем, внаслідок чого виникають патологічні процеси в органах та системах органів. Імунна система організму однією з найперших реагує на дію етанолу, що супроводжується розвитком імунодефіциту та зменшенням стійкості до інфекційних захворювань [2].

Останнім часом багато робіт присвячено вивченню біохімічних процесів, які виникають внаслідок хронічної дії алкоголю на імунну систему, проте залишається маловивченим функціонування сигнальної системи 2',5'-олігоаденілату (2',5'-А), яка індукується інтерфероном (ІФН). ІФН є родиною багатофункціональних цитокінів, які беруть участь в антивірусному захисті, регуляції клітинного росту, імунній активації, реакції клітин на зміну гормонального статусу, апоптозі та ін. [3, 4]. Дія ІФН I і III типу на клітини стимулює експресію генів різних ізоформ дсРНК-залежної 2',5'-олігоаденілат-синтетази (2',5'-ОАС) (АТР: полінуклеотид аденілілтрансфераза, 2.7.7.19) [5]. Цей ензим є одним з ключових компонентів системи трансдукції сигналу ІФН, який

синтезує разом з АТР короткі олігомери 2',5'-А, що складаються із залишків АМР, з'єднаних 2',5'-фосфодієфірними зв'язками. 2',5'-А активують ендорибонуклеазу (РНК-азу L), що призводить до розщеплення РНК, внаслідок чого припиняється синтез як вірусної, так і клітинної РНК. Важливо, що ензим 2',5'-ОАС є залученим у процеси розвитку імунної відповіді та запальні механізми, тому доцільно вивчити його активність у лімфоїдних клітинах тварин в умовах хронічної дії етанолу. Такі дослідження є важливими для пошуку шляхів корекції стану імунної системи та організму в цілому при хронічній алкогольній інтоксикації та запобігання розвитку алкогольної хвороби печінки, яка, як відомо, посіла 3–4 місце за смертністю через хронічне ураження печінки.

Сьогодні відомо, що розвиток алкогольної інтоксикації супроводжується дефіцитом цинку у низці органів [6]. Цей мікроелемент входить до складу активних центрів основних ензимів метаболізму етанолу – алкоголь- та альдегіддегідрогеназ. При його нестачі відбувається накопичення ацетальдегіду – метаболіту, що володіє токсичною та мутагенною дією; протеїнів, що беруть участь у генній експресії та метаболізмі нуклеїнових кислот, і відповідно всіх процесів клітинного росту та диференціації; протеїнів біологічних мембран, зокрема клітинних рецепторів понад 200 ензимних систем.

Для корекції дефіцитів цинку використовують солі цинку, серед яких малотоксичний оцтовокислий цинк [7]. Актуальним і

перспективним є дослідження можливості застосування цієї сполуки для корекції метаболічних уражень, які виникають під час розвитку алкоголізму, що може бути основою розробки нових профілактичних та лікувальних засобів.

Тому метою нашої роботи було вивчення активності ключового ензиму сигнальної системи інтерферону – 2',5'-ОАС в лімфоцитах селезінки щурів в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, викликаній введенням етанолу впродовж 21 доби, та дії на цей ензим оцтовокислого цинку.

### Матеріали і методи

У роботі дотримувались міжнародних рекомендацій про проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно Правил Європейської конвенції.

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 180–200 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Тварини були розділені на 3 групи: 1-ша – контрольні тварини; 2-га – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яку викликали пероральним введенням 40%-го розчину етанолу (з розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини раз на добу протягом 21 доби) за методом М. Х. Халілова і Ш. А. Закирходжаєва [8]; 3-тя – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким додатково вводили оцтовокислий цинк у дозі 0,2 г на 100 г маси тварини, що значно менше середньолетальної дози для білих щурів ( $LD_{50} = 278 \pm 49$  мг/кг) [9]. Тварин декапітували і видаляли селезінку.

Лімфоцити селезінки отримували центрифугуванням клітинної суспензії в градієнті Ficoll-Raque (густина 1,077) за методом [10] на 4, 6, 11, 16 та 21 добу після початку експерименту. Клітини заморожували в рідкому азоті, потім розморожували й центрифугували

зі швидкістю 10 000 г протягом 15 хв для отримання клітинного екстракту (супернатант) [11]; очищення екстракту проводили, як описано у роботі [12]. Активність 2',5'-ОАС оцінювали спектрофотометричним методом згідно з [12] за кількістю  $PP_i$ , що є одним з продуктів синтезу 2',5'-А з АТР під дією 2',5'-ОАС. Проводили каскадні реакції (див. схему).

У результаті описаних реакцій, які ініціюються  $PP_i$ , утвореним під дією 2',5'-ОАС, відновлюються NADPH. Кількість NADPH визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Оскільки  $PP_i$  утворюється по відношенню до NADPH з розрахунку 1 моль : 1 моль, кількість утвореного NADPH дорівнює кількості  $PP_i$ , за якою оцінювали активність 2',5'-ОАС. Активність ензиму виражали в наномолях  $PP_i$  за 1 хв на 1 мг протеїну.

Для створення необхідного середовища інкубації готували три буферні системи (рН 7,6): триетаноламінову суміш (ТМ), яка містить 7 мл 1 М триетаноламіну, 245 мкл льодяної оцтової кислоти; 2 мл 1 М ацетату магнію, 2 мл 1 М ацетату калію, 400 мкл 500 мМ ЕДТА, 200 мкл 1 М ДТТ, 88 мл  $H_2O$ ; АТР-суміш (АМ): 151 мг АТР (Sigma, США), 8,75 мл  $H_2O$ , 750 мкл 1 М триетаноламіну, 500 мкл 1 М ацетату магнію, 40 мкл 500 мМ ЕДТА; ензимну суміш (ЕМ): 3 мл ТМ, 6,5 мл  $H_2O$ , 300 мкл 100 мМ  $NADP^+$ , 200 мкл 100 мМ UDP-глюкози, 30 мкл 10 мМ глюкозо-1,6-дифосфату, 7,5 од. UDP-глюкозопірофосфорилази (печінка бика), 5 од. фосфоглюкомутази (м'язи кроля), 4 од. глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (дріжджі) (Sigma, США). Для визначення активності 2',5'-ОАС до 60 мкл очищеного клітинного екстракту додавали 120 мкл АМ, 400 мкл ЕМ, 600 мкл ТМ. Інкубацію проводили протягом 1 год при 37 °С, після чого вимірювали оптичну густину при 340 нм на спектрофотометрі.

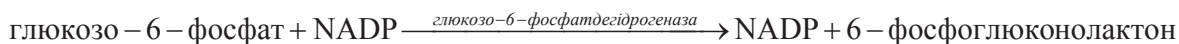
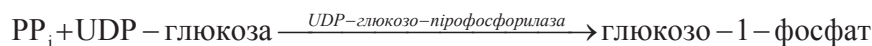
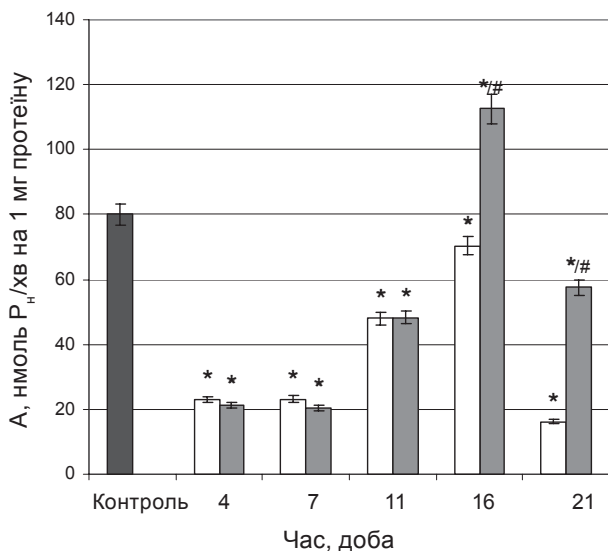


Схема каскадних реакцій

### Результати та обговорення

Одним з механізмів реакції імунної системи при хронічному алкоголізмі є порушення каскадів сигнальної трансдукції, які опосередковують розвиток імунної відповіді. До цих реакцій залучена велика кількість посередників різних систем трансдукції сигналу, зокрема, мітоген-активовані протеїнкінази, р38, сАМР [13]. Важливу роль у механізмі передачі сигналу відіграє 2',5'-А, який індукується ІФН. Роль цього каскаду у реакціях імунокомпетентних клітин на дію етанолу є невивченою. Оскільки в попередніх роботах було показано, що при хронічній алкогольній інтоксикації порушується функціонування цілого ряду сигнальних систем [14], слід очікувати також змін у каскаді ІФН.

Нами була визначена активність 2',5'-ОАС у лімфоїдних клітинах селезінки щурів у разі хронічної алкогольної інтоксикації, зумовленої введенням етанолу упродовж 21 доби. Встановлено, що введення етанолу піддослідним тваринам протягом 4 і 7 діб викликає зниження активності 2',5'-ОАС у лімфоцитах селезінки на 72% порівняно з контролем (рисунок). У подальші терміни досліджень (на 11-ту і 16-ту добу) активність 2',5'-ОАС починає зростати, але залишається зниженою відносно контролю на 40 і 22% відповідно. На 21-шу добу експерименту активність 2',5'-ОАС різко знижується та



Активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоцитах селезінки щурів при окремому введенні етанолу та сумісно з препаратами оцтовокислого цинку. \*  $P \leq 0,05$  відносно контролю (інтактні тварини); #  $P \leq 0,05$  відносно групи тварин, що отримувала лише етанол

набуває мінімальних значень (на 80% менша за контроль).

Таким чином, можна стверджувати, що при хронічній алкогольній інтоксикації відбувається зниження активності 2',5'-ОАС у спленоцитах щурів. Можливими причинами встановлених ефектів є зміни біосинтезу ензиму в клітині або порушення його структури, що знижує здатність його щодо утворення комплексів з регуляторами, наприклад, дсРНК.

Не слід виключати, що виявлене нами зниження активності 2',5'-ОАС може бути результатом пригнічення синтезу ІФН при хронічній алкогольній інтоксикації. Це припущення узгоджується з літературними даними, згідно яких в умовах тривалого споживання етанолу послаблювалась здатність лейкоцитів крові людей до продукції ІФН у відповідь на дію *in vitro* його індукторів – фітогемаглютиніну А і конканаваліну А [15]. Показано також, що етанол значно інгібував спонтанну та мітоген-стимульовану секрецію ІФН- $\gamma$  мононуклеарними клітинами периферійної крові людини [16]. Оскільки цей цитокін викликає імуностимулюючі ефекти, його нестача у людей, хворих на хронічний алкоголізм, призводила до розвитку порушень імунної системи.

Відомо, що етанол володіє мембранотропною дією – він дестабілізує структуру клітинних мембран, порушуючи властивості ліпідного бішару, результатом чого є зміна конформації мембранних рецепторів і втрата їхньої здатності взаємодіяти з лігандами [17]. Тому ймовірно, що під впливом етанолу можуть змінюватися ланки каскаду ІФН, які включають його взаємодію із специфічним рецептором.

За умов алкоголізму розвиток стресових реакцій клітин призводить до виникнення цинк-дефіцитного стану, наслідком чого є пригнічення репарації ДНК, синтезу протеїну і проліферації клітин. До того ж у разі нестачі цинку в клітині порушується функціонування багатьох ензимів, оскільки він стабілізує їхню структуру, зв'язуючись з SH-групами. Отже, зменшення активності 2',5'-ОАС може бути пов'язано зі зниженням вмісту цинку в клітині. Це узгоджується з даними, згідно з якими для прояву активності ензиму необхідна тетрамеризація протеїну, яка контролюється іонами  $Zn^{2+}$  [18].

Різне зниження активності 2',5'-ОАС в лімфоїдних клітинах селезінки щурів під час дії етанолу протягом 4–7 доби може бути проявом стресової реакції клітин. Це корелює з даними літератури про те, що за умов

алкоголізму імунна система зазнає значних уражень, зокрема, порушується виділення цитокінів імунокомпетентними клітинами [15, 16, 19]. Зростання активності ензиму на 11-ту добу слід розглядати як результат включення адаптаційних механізмів імунокомпетентних клітин у відповідь на дію етанолу. Зниження активності 2',5'-ОАС в умовах тривалої дії етанолу (на 21-шу добу) можна пов'язувати з накопиченням уражень у клітині (структури мембран, активність ензимних систем, процеси окислення тощо) та в імунній системі і організмі в цілому.

Як було зазначено раніше, для корекції стану організму при хронічному алкоголізмі є актуальним застосування сполук, які містять у своєму складі цинк [7]. Встановлено, що введення оцтовокислого цинку на 4-ту, 7-му і 11-ту добу не впливало на активність 2',5'-ОАС: вона не відрізнялася від такої у групі тварин, яка отримувала лише етанол, і була нижчою за контроль (рис.). На 16-ту добу досліджень активність 2',5'-ОАС зростала на 63% відносно значень у групі, що не отримували цинк і перевищувала контроль на 40%. Внаслідок введення етанолу протягом 21 доби активність ензиму зростала у 3,5 рази відносно значень для групи тварин, що не отримували цинк.

Отже, введення шурам оцтовокислого цинку сумісно з етанолом протягом 11 діб не впливало на активність 2',5'-ОАС. Ефект спостерігали лише в пізні терміни досліджень – на 16-ту і 21-шу добу, хоча максимальні значення активності були на 16-ту добу введення цинку. Треба відзначити, що введення оцтовокислого цинку було найбільш ефективним у разі тривалої дії алкоголю (протягом 21 доби), коли, як було показано, відбувалось найбільше зниження активності 2',5'-ОАС. За цих умов цинк виявляє тенденцію до нормалізації активності ензиму, що дає підстави розглядати оцтовокислий цинк як потенційний препарат для корекції стану організму при хронічному алкоголізмі. Важливим є те, що виявлені нами терміни введення сполуки співвідносяться з встановленими нами раніше часовими періодами накопичення цього іону в органах та тканинах щурів за цієї схеми введення.

Встановлене збільшення активності 2',5'-ОАС у разі введення цинку на фоні дії етанолу

може бути результатом стабілізації структури ензиму під впливом іонів  $Zn^{2+}$ , внаслідок чого він набуває здатності проявляти каталітичну активність. Крім цього, введення екзогенного оцтовокислого цинку, як було показано нами в попередніх роботах, відновлює ряд метаболічних показників (структурно-функціональний стан мембран, вміст продуктів ПОЛ, активність антиоксидантних ензимів тощо), порушених під час дії алкоголю [20].

Таким чином, встановлено, що в умовах хронічної алкогольної інтоксикації в лімфоцитах селезінки щурів пригнічується активність ключового ензиму системи ІФН – 2',5'-ОАС. Внаслідок збільшення терміну дії етанолу спостерігається зростання активності 2',5'-ОАС, проте в подальшому вона різко знижується. Введення оцтовокислого цинку тваринам сумісно з етанолом нормалізує активність 2',5'-ОАС, що проявляється в умовах тривалої дії алкоголю.

#### **АКТИВНОСТЬ 2',5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТ-СИНТЕТАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭТАНОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ВВЕДЕНИИ УКСУСНОКИСЛОГО ЦИНКА**

*В. А. Чайка, И. В. Компанец,  
Е. П. Гадилія, О. И. Харченко,  
Л. И. Остапченко*

Киевский национальный университет  
имени Тараса Шевченко, Украина;  
e-mail: rigik1979@mail.ru

Показано, что при хронической алкогольной интоксикации в лимфоцитах селезёнки крыс снижается активность интерферон-индуцированного энзима – 2',5'-олигоаденилат-синтетазы. Введение крысам уксуснокислого цинка совместно с этанолом вызывает повышение активности исследуемого энзима, с наиболее выраженным эффектом на поздних этапах развития алкогольной интоксикации.

**Ключевые слова:** лимфоидные клетки, хроническая алкогольная интоксикация, уксуснокислый цинк, 2',5'-олигоаденилат-синтетаза.

**THE ACTIVITY OF  
2',5'-OLIGOADENYLATE-SYNTHEASE  
IN RAT SPLEEN LYMPHOCYTES  
UNDER THE CHRONIC ETHANOL  
INTOXICATION AND INTRODUCTION  
OF ZINC ACETATE**

*V. O. Chaika, I. V. Kompanets, O. P. Gadilia,  
O. I. Kharchenko, L. I. Ostapchenko*

Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;  
e-mail: rigik1979@mail.ru

**S u m m a r y**

It was shown that the activity of interferon-induced enzyme 2',5'-oligoadenylate-synthetase is suppressed in rat spleen lymphocytes under the chronic alcohol intoxication. The values of enzyme activity were minimal under the long-term action of etanol (21 day). The combined administration of zinc acetate and etanol to rats causes the increase of enzyme activity, the effect is most expressed on the late stages of alcohol intoxication development.

**Key words:** lymphoid cells, chronic alcohol intoxication, zinc acetate, 2',5'-oligoadenylate-synthetase.

1. Дереча Л. М. // Вісник Харків. націон. університету. – 2007. – Вип. 6. – № 788. – С. 7–16.
2. Song K., Coleman R. A., Zhu X. et al. // J. Leukoc. Biol. – 2002. – 72. – P. 1109–1116.
3. Takaoka A., Yanai H. // Cel. Microbiol. – 2006. – 8, N 6. – P. 907–922.
4. Sadler A. J., Williams B. R. G. // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – 8, N 7. – P. 559–568.
5. Hovanessian A.G., Justesen J. // Biochimie. – 2007. – 89, N 6–7. – P. 779–788.
6. Берегова Т. В., Григорова Н. В., Єщенко Ю. В. та ін. // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2008. – 1, № 41. – С. 49–52.
7. Гуртовенко В. М., Проскурякова Т. В., Шумалов И. Н., Кудрявцев Р. В. // Патол. физиол. и exper. терапия. – 1988. – № 2. – С. 58–61.
8. Халилов М. Х., Закихорджаев Ш. Я. // Вопросы клиники алкоголизма: Сб. науч. тр., Ташкент, 1983. – С. 38–41.
9. Берегова Т. В., Григорова Н. В., Єщенко Ю. В. та ін. // Фізіол. журн. – 2007. – 53, № 4. – С. 10–104.
10. Воут А. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – 21. – P. 28–30.
11. Mechti N., Affabris E., Romeo G. et al. // J. Biol. Chem. – 1984. – 259, N 5. – P. 3261–3265.
12. Justensen J., Kjeldgaard N. O. // Anal. Biochem. – 1992. – 207, N 1. – P. 90–93.
13. Chen G., Ma C., Bower K. A., Ke Z., Luo J. // J. Biol. Chem. – 2006. – 281, N 23. – P. 15909–15915.
14. Харченко О. І., Чайка В. О., Гавриш Л. І. та ін. // Фізика живого. – 2008. – 16, № 1. – С. 111–115.
15. Daniluk J., Kandefer-Szerszeń M. // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 1994. – 42, N 3. – P. 231–238.
16. Wagner F., Fink R., Hart R., Lersch C. et al. // J. Stud. Alcohol. – 1992. – 53, N 3. – P. 277–280.
17. Семіна И., Файзуллин Д., Ступишина Е. // Структура и динамика молекул. систем. – 2003. – вып. X, ч. 2. – С. 246–249.
18. Ghosh A., Desai S. Y., Sarkar S. N. et. al. // J. Biol. Chem. – 1997. – 272, N 24. – P. 15452–15458.
19. Redwine L., Dang J., Hall M., Irwin M. // Psychosom. Med. – 2003. – 65. – P. 75–85.
20. Харченко О. І., Чайка В. О., Богун Л. І. та ін. // Фізика живого. – 2009. – 17, № 2. – С. 112–119.

Отримано 08.02.2010