

І.В. Компанець, І.О. Степанець, В.В. Войтенко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко

Активність інтерферонзалежної 2',5'-олігоаденілат-синтетази в лімфоїдних клітинах тимуса щурів при сумісній дії етанолу та препарату оцтовокислого цинку

Вивчено вплив 28-добового комплексного введення етанолу та препарату оцтовокислого цинку на активність інтерфероніндукованого ферменту 2',5'-олігоаденілатсинтетази (2',5'-ОА-синтетази) у лімфоцитах тимуса щурів. На ранніх термінах дії етанолу (14-та доба) 2',5'-ОА-синтетазна активність знижувалася найбільше (відносно контролю), на пізніших термінах зміни були менш вираженими. Стимуляція активності ферменту у відповідь на дію індуктора інтерферону (циклоферону) in vitro найбільш виражена на пізніх термінах дії етанолу. Введення оцтовокислого цинку сумісно з етанолом збільшує 2',5'-ОА-синтетазну активність відносно групи тварин, що споживала лише етанол, на 81 % на 21-шу добу і на 30 % на 28-му добу (тенденція до нормалізації цього показника). Препарат посилював індуквану циклофероном стимуляцію активності ферменту, що було максимальним при тривалій дії етанолу (на 28-му добу). Імовірно, при дії етанолу пригнічується синтез інтерферону або порушується індукований ним каскад 2',5'-олігоаденілату; оцтовокислий цинк посилює синтез інтерферону.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, інтерферон, 2',5'-олігоаденілатсинтетаза, тимоцити, циклоферон.

ВСТУП

Велику кількість робіт присвячено вивченню біохімічних механізмів дії алкоголю на організм, зокрема, особливу увагу приділено функціонуванню імунної системи [1]. Показано, що при хронічній дії етанолу в організмі пригнічується природжений імунітет: порушується дозрівання Т-клітин, зменшується активність натуральних кілерів, розвивається запальний процес і знижується стійкість організму до інфекційних захворювань [2, 3].

Припускають, що одним з механізмів, за яким етанол пригнічує природжений імунітет, є порушення клітинних сигнальних каскадів, залучених у його реалізації. Встановлено зміни продукції цитокінів лімфоцитами не тільки печінки, а й лімфоїдних органів [4], зокрема, співвідношення проти- і прозапальних цитокінів IL-6/IL-10 [5].

Значних змін зазнає секреція інтерферону (ІФН) лімфоцитами тварин і людини, які підлягали дії етанолу [4, 6]. Сигнальний каскад 2',5'-олігоаденілату (2',5'-ОА) індукується ІФН I типу й опосередковує його антивірусні, антипроліферативні та імунорегуляторні властивості [7]. 2',5'-олігоаденілатсинтетаза (2',5'-ОА-синтетаза) – ключовий фермент цього каскаду, який каталізує синтез 2',5'-олігоаденілатів з АТФ [8].

Показано, що при дії етанолу in vitro зазнає змін експресія гена ІФН-індукованого ферменту 2',5'-ОА-синтетази [6]. Найбільш докладно вивчено вплив етанолу на сигналізацію в ІФН-індукованих системах у печінці, відомості щодо ролі ІФН у реакції лімфоїдних органів на хронічне вживання алкоголю є суперечливими та потребують уточнення.

Одним з біохімічних наслідків алкоголізму та алкогольної хвороби печінки (АХП) є

© І.В. Компанець, І.О. Степанець, В.В. Войтенко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко

дефіцит цинку, причому особливо чутливою до нього є імунна система [9]. У попередніх дослідженнях встановлено зниження вмісту цинку в гепатоцитах, мозку та сироватці крові щурів у динаміці розвитку хронічної алкогольної інтоксикації [10]. Зниження вмісту цинку в організмі пригнічує продукцію цитокінів Th1-лімфоцитами, зокрема ІФН- α , викликає зміни антитілозалежної імунної відповіді, атрофію тимуса, лімфопенію, що знижує стійкість до інфекційних захворювань та алергічних реакцій [11].

Препарати цинку використовуються для усунення порушень на тлі алкоголізму, причому одним з найменш токсичним серед них є оцтовокислий цинк [12]. Актуально вивчити ефект цинку при тривалій дії етанолу на функціонування в лімфоцитах каскадів, що індукуються цитокінами.

Мета роботи – оцінити активність ІФН-індукованого ферменту 2',5'-ОА-синтетази у лімфоцитах селезінки і тимуса щурів при сумісному введенні етанолу та препарату оцтовокислого цинку упродовж 28 діб, а також вивчити вплив на цей показник індуктора ІФН (циклоферону) *in vitro*.

МЕТОДИКА

Дослідження було проведено на білих нелінійних щурах-самцях віком до 2 міс, масою 180–200 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з вільним доступом до води. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з принципами “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей” (Страстбург, 1986) і Ухвали першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Тварин було розділено на 3 групи по 10 тварин у кожній: 1-ша група – інтактні тварини (контроль); 2-га група – щури, яким вводили 40%-й етанол («Біофарма» Україна) упродовж 28 діб натщесерце зондом з медичної сталі з розрахунку 2 мл/100 г раз на добу за стандартною методикою Халілова

та Закірходжаєва [13]; 3-тя група – щури, яким вводили оцтовокислий цинк (“Sigma”, США) *per os*, починаючи з 14-ї доби розвитку введення етанолу (препарат розчиняли у воді та вводили окремо від етанолу у дозі 20 мг/1 кг, що було значно менше за середньолетальну дозу для білих щурів ($LD_{50} = 278 \pm 49$ мг/кг) [14, 15]. Смертність серед дослідних тварин не спостерігалась. Проби тканин для аналізу відбирали на 14-ту, 21-ту та 28-му добу експерименту. Евтаназію тварин здійснювали дислокацією шийних хребців через добу після останнього введення препарату, видаляли тимус і отримували суспензію клітин, використовуючи середовище 199 (модифікований NEPEES, солі Ерла, L-глютамін і 25 ммоль/л NEPEES, без бікарбонату натрія, “Sigma”, США). Тимоцити виділяли за методом Морозова та Хавінсона [16], центрифугуючи суспензію клітин тимуса за швидкості 1500 г упродовж 10 хв. Кількість загиблих клітин визначали фарбуванням 0,2%-м трипановим синім у камері Горяєва, життєздатні клітини в усіх експериментах становили не менше 92 %.

Тимоцити інкубували *in vitro* з циклофероном у концентрації 100 мкг / мл на $5 \cdot 10^6$ клітин / мл. Тимоцити інкубували в пробірках з циклофероном («Полісан» Росія) у середовищі 199 (“Sigma”, США) при 37°C упродовж 17 год. Циклоферон індукує в лімфоцитах синтез ІФН- α й ІФН- γ та ефективно використовується для лікування вірусних захворювань [17]. Клітини руйнували методом швидкого заморожування–розморожування в рідкому азоті та центрифугували за швидкості 10 000 г упродовж 15 хв [18], отриманий супернатант очищали на колонці DEAE-cellulose з елюцією 0,15 моль/л KCl згідно з літературними даними [19, 20] з модифікаціями. 2',5'-ОА-синтетазну активність визначали спектрофотометричним методом за кількістю відновленого НАДФ, який був еквімолярним до неорганічного пірофосфату (PP_n), що утворювався в реакції синтезу 2',5'-ОА під дією 2',5'-ОА-синте-

тази [20]. Використані реагенти були фірми «Sigma», США. Активність ферменту виражали в наномольах $PP_n / (1 \text{ хв} \cdot 1 \text{ мг білка})$. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [21].

Статистичну обробку результатів досліджень і оцінку їх достовірності здійснювали за допомогою програми Statistica 7.0 з використанням критерію t Стьюдента. Відмінності вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було вивчено сумісний вплив етанолу та оцтовокислого цинку на активність ключового ферменту ІФН-індукованої системи 2',5'-ОА - 2',5'-ОА-синтетази у клітинах лімфоїдних тимуса щурів без стимуляції, а також при дії *in vitro* індуктора ІФН-циклоферону.

Аналіз отриманих результатів показав, що 2',5'-ОА-синтетазна активність у тимоцитах щурів знижується при споживанні ними етанолу протягом 28 діб, причому зниження є максимальним (на 75 % відносно контролю) на ранніх етапах експерименту (14-та доба; рис. 1). На пізніх термінах (21-ша і 28-ма доба) цей показник зменшувався на 57 і 31 % відповідно. Індукована циклофероном *in vitro* активність ферменту в ізольованих лімфоцитах тимуса щурів контрольної групи

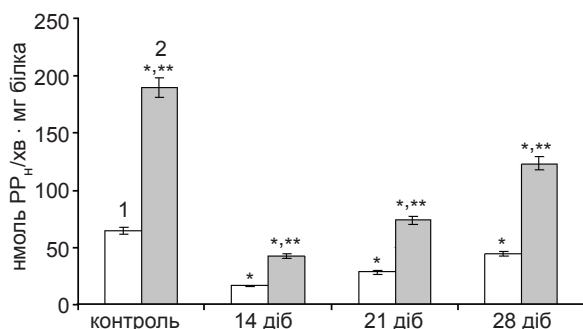


Рис. 1. 2',5'-Олігоаденілатсинтетазна активність у лімфоцитах тимуса щурів при введенні етанолу упродовж 28 діб при дії циклоферону *in vitro*: 1 – без індуктора, 2 – інкубація клітин з циклофероном. * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** $P \leq 0,05$ відносно клітин, які не інкубувалися з циклофероном

підвищувалася на 192 % відносно нестимульованих клітин тварин відповідної групи, а на 14-ту, 21-шу і 28-му добу введення етанолу вона збільшувалася на 157, 162 і 175 % відносно нестимульованих клітин відповідно. Це свідчить про те, що при дії етанолу пригнічується стимуляція 2',5'-ОА-синтетазної активності у відповідь на дію індукторів ІФН. При збільшенні терміну впливу етанолу індукована циклофероном активність підвищується, що корелює з результатами щодо активності у нестимульованих лімфоцитах.

Зниження 2',5'-ОА-синтетазної активності у тимоцитах алкоголізованих тварин і пригнічення її стимуляції при дії циклоферону *in vitro* дає підстави припустити, що при дії етанолу пригнічується синтез ІФН лімфоцитами тимуса. Це узгоджується з даними про зниження продукції ІФН лейкоцитами крові людей у відповідь на дію *in vitro* таких індукторів, як фітогемаглютинін А та конканавалін А та різке пригнічення секреції ІФН- α і ІФН- γ нестимульованими лейкоцитами при алкогольному стеатозі та цирозі печінки [22].

Факт пригнічення 2',5'-ОА-синтетазної активності лімфоцитів алкоголізованих тварин у відповідь на стимуляцію клітин циклофероном узгоджується з даними про зниження ефективності терапії інтерфероном вірусних інфекцій, що виникають на тлі алкоголізму [23]. В осіб, хворих на хронічний алкоголізм, знижена фізіологічна відповідь на вплив екзогенно введеного ІФН. Це проявляється, зокрема, в тому, що індукована ним активність 2',5'-ОА-синтетази набагато нижча, ніж у здорових людей [24].

Виявлене нами підвищення ферментативної активності зі збільшенням терміну дії етанолу у нестимульованих та інкубованих з циклофероном тимоцитах, імовірно, є адаптаційною реакцією, при якій здатність цих клітин до продукції ІФН у відповідь на екзогенні стимули частково відновлюється.

Внаслідок впливу етанолу може змінюватися передача сигналу в індукованій ІФН

системі 2',5'-ОА. Доведено, що етанол викликає у клітинах оксидативний стрес [25]. Це порушує експресію білків системи Jak-Stat, яка опосередковує дію ІФН- α на клітини, що проявляється у зниженні його противірусної активності [23].

Слід зазначити, що ефект етанолу на систему ІФН не пов'язаний тільки зі стимуляцією чи інгібуванням, а є результатом взаємних впливів цілої низки процесів, які спостерігаються при взаємодії компонентів багатьох сигнальних шляхів [23]. Реакція на вживання алкоголю залежить від типу дії етанолу (гострої чи хронічної), його дози, а також від того, чи метаболізується він в організмі.

Показано, що оцтовокислий цинк підвищує 2',5'-ОА-синтезну активність у тимоцитах щурів на тлі дії алкоголю на 81 і 30 % на 21-шу і 28-му добу експерименту відповідно відносно тварин, які споживали лише етанол (рис. 2, а, б). На 28-му добу активність наближалася до контрольних значень. На ранніх термінах дослідження (упродовж 11 діб) цей показник статистично достовірно не змінювався. Введення тваринам контрольної групи оцтовокислого цинку упродовж 28 діб не впливало на активність ферменту у нестимульованих індуктором клітинах.

При інкубації тимоцитів алкоголізованих щурів з циклофероном *in vitro* 2',5'-ОА-синтезна активність підвищувалася відносно нестимульованих індуктором клітин на 176 і 180 % відповідно на 21-шу і 28-му добу сумісного введення тваринам етанолу й оцтовокислого цинку (див. рис. 2,а,б). Стимуляція активності ферменту у відповідь на циклоферон була більш інтенсивною порівняно з такою у тварин, що отримували лише етанол. Проте вона була менш вираженою щодо контрольних тварин, яким вводили оцтовокислий цинк (при інкубації лімфоцитів їхнього тимуса з циклофероном активність збільшувалася відносно нестимульованих клітин на 202 і 209 % відповідно, на 21-шу і 28-му добу введення препарату).

Ми припускаємо, що оцтовокислий цинк на тлі дії алкоголю стимулює синтез ІФН тимоцитами, проявом чого є збільшення 2',5'-ОА-синтезної активності. Цей препарат також посилює здатність тимоцитів до продукції ІФН у відповідь на індукцію, що є найбільш вираженим при тривалій дії етанолу. Стимульований ефект цинку на секрецію ІФН було описано у Sakman та співавт. [26]: фізіологічні концентрації цього металу відновлювали знижену продукцію цитокіну *in vitro*.

Ймовірно, цинк нормалізує функціонування лімфоцитів тимуса, яке порушується при дії етанолу. Показано, що згаданий катіон регулює гомеостаз Т-лімфоцитів, стимулює їх дозрівання, модулює секрецію цитокінів, змінюючи функціонування багатьох сигнальних систем [11]. Крім цього, цинк необхідний для прояву біологічної активності великої

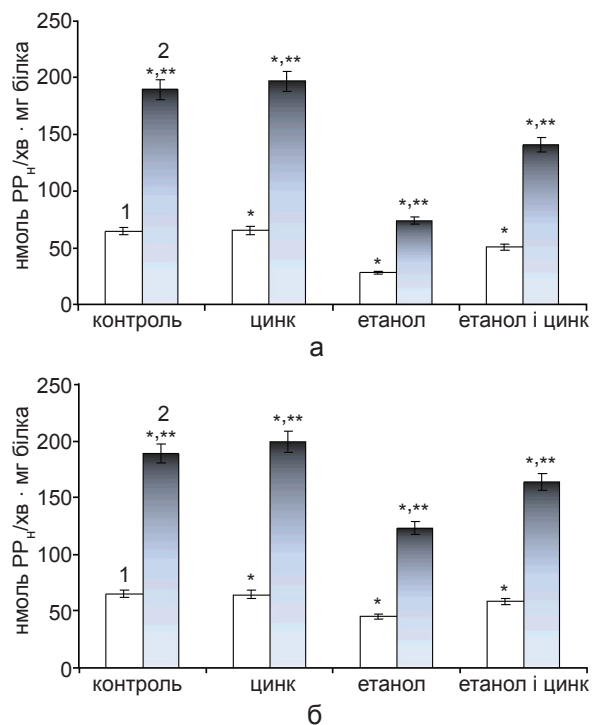


Рис. 2. 2',5'-Олігоаденілатсинтезна активність у лімфоцитах тимуса щурів на 21-шу та 28-му добу сумісного введення етанолу та оцтовокислого цинку при дії циклоферону *in vitro*: 1 – без індуктора, 2 – інкубація клітин з циклофероном. * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** $P \leq 0,05$ відносно клітин, які не інкубувалися з циклофероном

кількості білків (цитокінів, факторів росту, транскрипційних факторів) [27]. Тому встановлена нами стимуляція Zn^{2+} -активності цього ферменту може бути результатом відновлення нормального функціонування ІФН-індукованої системи 2',5'-ОА в лімфоцитах. У попередніх дослідженнях було показано, що цей препарат нормалізує вміст мембранних фосфоліпідів, активність мембранозв'язаних ферментів і ферментів системи антиоксидантного захисту, які змінюються при дії етанолу [28].

Таким чином, сполуки цинку слід розглядати як потенційні препарати, що можна застосовувати для відновлення метаболічних процесів при алкоголізмі. Отримані результати важливі для з'ясування механізмів імунної відповіді на тлі тривалої дії етанолу.

**І.В. Компанець, І.О. Степанець, В.В. Войтенко,
Д.Н. Гребиник, Л.І. Остапченко**

АКТИВНОСТЬ ИНТЕРФЕРОНЗАВИСИМОЙ 2',5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТСИНТЕТАЗЫ В ЛИМ- ФОИДНЫХ КЛЕТКАХ ТИМУСА КРЫС ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА И ПРЕПАРАТА УКСУСНОКИСЛОГО ЦИНКА

Изучено влияние 28-суточного комплексного введения этанола совместно с препаратом уксуснокислого цинка на активность интерферониндуцированного фермента 2',5'-олигоаденилатсинтетазы (2',5'-ОА-синтетазы) в лимфоцитах тимуса крыс. На ранних сроках действия этанола (14-е сутки) 2',5'-ОА-синтезазная активность наиболее снижалась (на 75 % относительно контроля), на поздних сроках изменения были наименее выраженными. Стимуляция активности фермента в ответ на действие индуктора интерферона (циклоферона) *in vitro* наиболее выражена на поздних сроках действия этанола. Введение уксуснокислого цинка совместно с этанолом увеличивает 2',5'-ОА-синтезазную активность относительно группы животных, которая употребляла только этанол, на 81 % на 21-е сутки и на 30 % на 28-е сутки (тенденция к нормализации этого показателя). Препарат усиливал индуцированную циклофероном стимуляцию активности фермента, что было максимальным при длительном действии этанола (на 28-е сутки). Вероятно, при действии этанола угнетается синтез интерферона или нарушается индуцированный им каскад 2',5'-олигоаденилата; уксуснокислый цинк усиливает синтез интерферона.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, интерферон, 2',5'-олигоаденилатсинтезаза, тимоциты, циклоферон.

**I.V. Kompanets, I.O. Stepanets, V.V. Voytenko,
D.M. Grebinyk, L.I. Ostapchenko**

THE ACTIVITY OF INTERFERON-DEPENDENT 2',5'-OLIGOADENYLATESYNTHE- TASE IN RAT THYMUS LYMPHOID CELLS UNDER THE ACTION OF ETHANOL AND ACETIC ZINC ADMINISTRATION

The activity of interferon-induced 2',5'-oligoadenylatesynthetase (2',5'-OA-synthetase) in thymocytes of rats simultaneously treated with ethanol and acetic zinc preparation was studied. The 2',5'-OA-synthetase activity was decreased by 75% after daily ethanol administration for 14 days. The changes were less pronounced at the late terms of the experiment. *In vitro* stimulation of enzyme activity by inducer cycloferon was more pronounced at the late terms of ethanol action. Combined administration of ethanol and acetic zinc increased the 2',5'-OA-synthetase activity (by 81% at 21th day and by 30% at 28th day) in comparison to the group of animals that consumed ethanol only. The zinc preparation augmented the stimulation of enzyme activity induced by cycloferon, the effect was most prominent at the late terms of the ethanol action (at 28th day). Probably, ethanol depresses the synthesis of interferon or disturbs the functioning of 2',5'-oligoadenylate cascade. The acetic zinc amplifies the interferon synthesis. Key words: alcohol intoxication, interferon, 2',5'-oligoadenylatesynthetase, thymocytes, cycloferon.

Taras Shevchenko National University, Kyiv

REFERENCES

1. Albano E, Vidali M. Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr.* 2010; 5:141-147.
2. Pan HN, Sun R, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30(9):1615-123.
3. Albano E. Role of adaptive immunity in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol.* 2012; 2012:893026.
4. Pan HN, Sun R, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol.* 2002; 72(6):1109-1116.
5. Redwine L, Dang J, Hall M, Irwin M. Disordered sleep, nocturnal cytokines, and immunity in alcoholics. *Psychosom Med.* 2003; 65(1):75-85.
6. Chelbi-Alix MK, Chousterman S. Ethanol induces 2',5'-oligoadenylate synthetase and antiviral activities through interferon-beta production. *J Biol Chem.* 1992; 267(3): 1741-1745.
7. Forster S. Interferon signatures in immune disorders and disease. *Immunol Cell Biol.* 2012; 90(5):520-527.
8. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 2011; 1(6):519-525.

9. Zhou Z. Zinc and alcoholic liver disease. *Dig Dis.* 2010; **28**(6):745-750.
10. Kharchenko OI, Bogun LI, Ostapchenko LI. Zinc level in cells of rat different organs at chronic alcohol intoxication and zinc treatment. *Pharmacology and medical toxicology.* 2012; **3**(28):57-60.
11. Rink L, Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J Nutr.* 2000; **130**(5S Suppl):1407S-14011S.
12. Skalniy AV, Kampov-Polevoy AB, Voronin AYe. The influence of zinc on the activity of ethanol-oxidizing enzymes in descendant of alcoholized rats. *Microelements in medicine.* 2000; **2**(2):21-23.
13. Halilov MCh, Zakirchodjaev ShYa. Characteristics of some pathochemical alterations in blood, liver and brain tissue in experimental alcoholic intoxication // *Problems of Alcoholism Clinic: Collected articles, Tashkent, 1983.* - P.38-41.
14. Beregova T.V., Grigorova N.V., Eschenko Yu, V. et al. The effect of acute and chronic alcoholization on zinc content in blood // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry.* - 2008. - Vol. **1**(41). - P.49-53.
15. Morozov VG, Chavinson VH. Immunological Function of Thymus. *Advances of Actual Biology.* 1985; **97**(1):36-49.
16. Romantsov MG, Ershov FI, Kovalenko AL. Cycloferon in treatment on infectious diseases. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2008; **53**(3-4):36-45.
17. Mechti N, Affabris E, Romeo G, Lebleu B, Rossi GB. Role of interferon and 2',5'-oligoadenylate synthetase in erythroid differentiation of Friend leukemia cells. Studies with interferon-sensitive and -resistant variants. *J Biol Chem.* 1984; **259**(5):3261-3265.
18. Rovnak J, Ranu RS. Purification of 2',5'-oligoadenylate synthetase from rabbit reticulocytes. *J Interferon Res.* 198; **7**(2):231-241.
19. Justesen J, Kjeldgaard NO. Spectrophotometric pyrophosphate assay of 2',5'-oligoadenylate synthetase. *Anal Biochem.* 1992; **207**(1):90-93.
20. Bradford MM. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 1976; **72**:248-254.
21. Daniluk J, Kandefers-Szerszeń M. Interferon production by peripheral blood cells of patients with alcoholic liver disease (ALD). *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1994; **42**(3):231-238.
22. Plumlee CR, Lazaro CA, Fausto N, Polyak SJ. Effect of ethanol on innate antiviral pathways and HCV replication in human liver cells. *Virology.* 2005; **2**:89.
23. Ono K, Sata M, Murashima S, Fukuizumi K, Suzuki H, Tanikawa K. Biological responses to administered interferon in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; **20**(9):1560-1563.
24. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol.* 2002; **27**(1):63-68.
25. Cakman I, Kirchner H, Rink L. Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon- α by leukocytes from elderly persons. *J Interferon Cytokine Res.* 1997; **17**(8):469-472.
26. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem.* 2011; **16**(7):1123-34.
27. Charchenko OI, Chayka VO, Bogun LI, Kovalova VA, Ostapchenko LI. The influence of acetic zinc on phospholipid composition of plasma membranes of different organs of rats at chronic alcoholic intoxication. *Physics of Alive.* 2009; **17**(2):112-119.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: i_kompanets@mail.ru

Матеріал надійшов
до редакції 14.03.2013