УДК 577.127:616.379-008.64

Ю. Омельченко, асп, О. Сокур, д-р біол. наук,
Л. Остапченко, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗИ МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ СФОРМОВАНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ЗАЛЕЖНІСТЮ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ

Досліджено вплив оцтовокислого цинку на загальну активність NO-синтази та iNO –синтази в клітинах головного мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю. Виявлено індукцію NO-синтази за рахунок її індуцибельної форми в експериментальній групі щурів, які постійно вживали алкоголь протягом 8 тижнів. Застосування оцтовокислого цинку не призводило до повної нормалізації активності ферментів, що може бути пов'язано з переважним впливом цинку на експресією iNOS.

Ключові слова: NO-синтаза, мозок, оцтовокислий цинк, алкогольна залежність.

Вступ. Експериментальними і клінічними дослідженнями показано, що хронічна алкогольна інтоксикація викликає функціональні і морфологічні порушення практично всіх систем та структур головного мозку [1]. В першу чергу етанол уражує нейрони нової кори, гіпокампу та півкуль мозочку впливаючи на нейромедіатори та змінюючи синаптичну передачу [2]. Серед багатьох біологічних процесів, які обумовлюють такі наслідки вживання алкоголю, певна роль відводиться оксиду азоту (NO). Функції оксиду азоту в ЦНС доволі різнопланові: він контролює активність нейронів, є медіатором ноцицепції, термогенезу, регулює вихід нейромедіаторів, грає важливу роль в процесах довгострокової потенціації, і, відповідно пам'яті та ін. [3]. В фізіологічних умовах NO захищає головний мозок від ішемічного та нейротиксичних впливів, тоді як в умовах патології може посилювати деструктивні процеси. Вважається, що у механізмі розвитку алкогольної інтоксикації важливу роль відіграє порушення вмісту мікроелементів,спектр біологічної дії яких визначається взаємодією з ферментами, гормонами, нейромедіаторами, пептидами та іншими біологічно активними речовинами [4]. На думку ряду авторів, порушення мінерального обміну (особливо цинку) може бути одним з пускових механізмів метаболічних розладів за умов алкогольної інтоксикації [5]. Цинк входить до складу білків, що беруть участь у генній експресії та метаболізмі нуклеїнових кислот, процесах клітинного росту та диференціації, він є структурним компонентом біологічних мембран, клітинних рецепторів, протеїнів, та ін. Для корекції дефіцитів цинку використовують їх солі, серед яких низькою токсичністю характеризується оцтовокислий цинк [6]. Актуальним і перспективним вважається його застосування для корегування метаболічних уражень, які виникають під час розвитку алкоголізму, що може бути основою розробки нових лікувальних протиалкогольних засобів. Метою роботи було дослідити вплив оцтовокислого цинку на активність NO-синтази мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-200 г. Проведенні дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.) та згідно етичних норм у відповідності до українського законодавства. Сьогодні при дослідженні можливих механізмів впливу алкоголю на організм в основному використовують моделі хронічної алкоголізації з примусовим споюванням тварин. Однак більш наближеними до реальної ситуації є моделі формування алкогольної залежності з можливістю вільного вибору тваринами етанолу. Алкогольна залежність у тварин в хронічному експерименті формувалась в умовах вільного вибору між 40 % розчином етанолу та водою протягом 2 місяців [7]. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Алкогольну залежність формували за наступною схемою: щурів розсаджували в індивідуальні клітки з двома пляшечками: одна містила мірну кількість води, а інша – 40% розчину етанолу. Кожної доби протягом місяця проводили вимірювання кількості випитого етанолу. Через місяць після початку експерименту тварин розподіляли на 3 групи. До 1 групи відносили інтактних тварин (контроль), до 2 групи – щурів з сформованою алкогольною залежністю, у яких споживання етанолу протягом доби становило 2 мл та більше. 3 група – щури, яким додатково протягом останнього місяця вводили оцтовокислий цинк в дозі 2 мг на 1 кг маси тварини перорально [8]. Тварин забивали методом дислокації шийних хребців, декапітували, після чого шляхом розтину черепної коробки мозок тварини видаляли з основи черепа, підрізавши черепно-мозкові нерви, промивали фізіологічним розчином та в подальшому гомогенізували. Визначення загальної активності NO-синтази в клітинах мозку щурів проводили стандартним спектрофотометричним методом. Визначення активності NO-синтази засноване на комбінації класичного метода [9] та сучасної його модифікації [10], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Активність ферменту виражали в пмоль L-цитруліну на мг білка за хв. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми Statistica 7 з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. У результаті досліджень нами було встановлено, що системне споживання алкоголю призводило до зростання активності NO-синтази в клітинах мозку щурів на 280% (4 тиждень експерименту) у порівнянні із контролем (рис.1). В подальші терміни досліджень (5-8 тиждень) активність ферменту залишалась підвищеною і на 8 тиждень експерименту перевищувала контрольні показники на 70 %. Встановлене нами зростання активності NO-синтази клітин мозку за умов розвитку алкогольної залежності узгоджується з рядом досліджень [3], де продемонстровано, що введення етанолу призводить до збільшення вмісту оксиду азоту та його похідних у мозку. Показано, що у людей, які систематично вживають алкоголь відбувається зростання вмісту стійких метаболітів оксиду азоту – нітратів та нітритів, причому автори вважають, що формування NO• може бути пов'язаним з розвитком толерантності до алкоголю. Оксид азоту може сприяти руйнуванню гематоенцефалічного бар'єру, зумовлюючи вазогенний набряк і ушкодження мозку [11]. Дослідженнями останніх років встановлено, що NO, і особливо продукти його перетворення, такі як пероксинітрит ($ONOO^-$), іон нітрозонію (NO^+), нітроксил (NO^-) є основними факторами реалізації нітрозилюючого стресу, в результаті якого відбувається пряма взаємодія NO з металами (гемове залізо гемоглобіну, міоглобіну, залізовмісних ферментів, ДНК, міддю та цинку

© Омельченко Ю., Сокур О., Остапченко Л., 2014

активних центрів ферментів), а також не пряма взаємодія NO^+ (S,N,O нітрозилювання) з тіольними, фенольними, гідроксильними та аміногрупами білків і ДНК. Подібний вплив призводить до десенситації рецепторів, пригніченню активності мітохондріальних ферментів, фрагментації нуклеїнових кислот та, як наслідок до апоптозу. Отже, індукція цього ферменту при хронічній алкогольній інтоксикації є додатковим фактором поглиблення нітрозативного стресу у клітинах мозку, особливо за рахунок формування пероксинітриту та інших нітроокисних похідних.

Нами було встановлено, що застосування оцтовокислого цинку у тварин, які споживали алкоголь призводило до зниження активності NO-синтази (1-4 тиждень) на 44%,16%,14%, та 24% відповідно, але перевищувала контрольні показники в середньому на 56%.

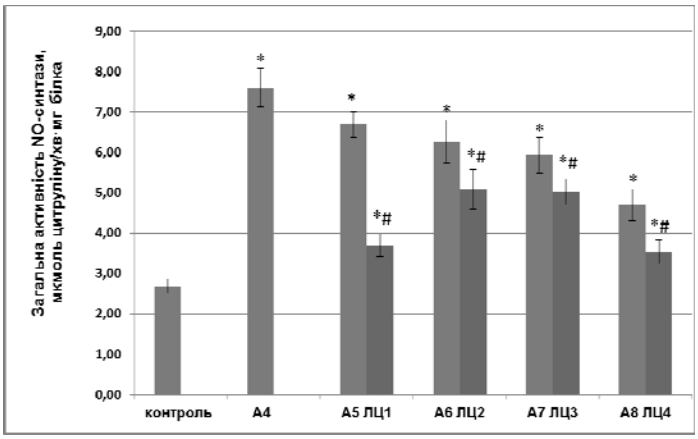

Рис. 1. Загальна NO-синтазна активність клітин мозку щурів при введенні оцтовокислого цинку за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації

1 – контроль;
А4 – А8 – 4-8 тижні хронічної алкоголізації;
ЛЦ1-ЛЦ4 – введення оцтовокислого цинку на 5-8 тиждень хронічної алкоголізації.
** – p ≤0,05 порівняно з показниками тварин контрольної групи*
 # – p ≤ 0,05 порівняно з показниками тварин експериментальної моделі алкоголізації.

Варто відмітити, що інгібування активності NO-синтази може призводити до збільшення тривалості сну, викликаних вживанням етанолу; полегшувати симптоми виведення алкоголю; посилювати транквілізуючі ефекти етанолу; попереджувати розвиток толерантності до етанолу; знижувати норму споживання спирту у щурів, які віддають перевагу алкоголю [12]. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів, які показали, що сполуки цинку можуть інгібувати активність NO-синтази за умов хронічної алкогольної інтоксикації [13]. Одним з факторів, що визначають активність NO-синтази є доступність субстрату – L-аргініну. Поява у клітині метильованих форм цієї амінокислоти призводить до значного інгібування активності досліджуваного ферменту. Основним шляхом їх синтезу є переніс метильної групи S-аденозил-L-метіоніна за допомогою відповідних N-метилтрансфераз на гуанідиновий азот аргінінових залишків білків. Протеоліз останніх призводить до вивільнення N-метиларгінінів, які є сильними інгібіторами ізоформ NO-синтаз. У літературі є дані про те, що за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації відбувається зниження активності метилтрансфераз, у той час як введення сполук цинку, навпаки, призводить до активації цих ферментів [14]. Тому, однією з можливих причин зниження активності NO-синтази при введенні оцтовокислого цинку на фоні хронічної алкогольної інтоксикації може бути зростання вмісту N-метиларгінінів.

Відомо, що цинк входить до складу всіх ізоформ NO-синтази і його застосування може призвести до зростання активності ферменту [15].

Нами було досліджено вплив оцтовокислого цинку на загальну активність NO-синтази та її індуцибельної форми – iNOS в клітинах мозку інтактних щурів. Встановлено, що застосування оцтовокислого цинку протягом 4 тижнів призводило до зростання загальної NO-синтазної активності в клітинах мозку щурів в середньому на 38% (рис.2).

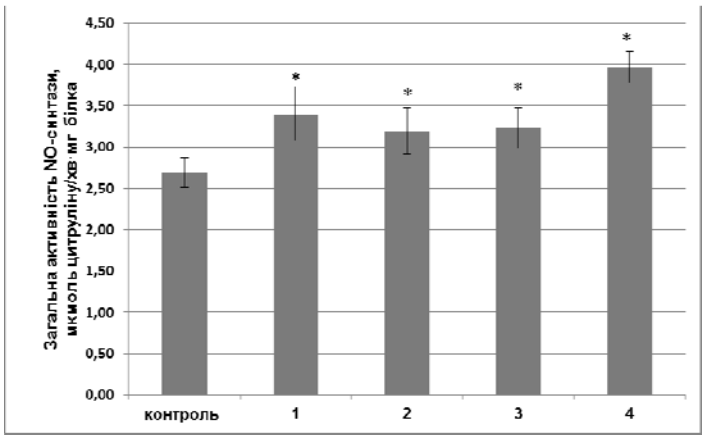

Рис. 2. Загальна NO-синтазна активність клітин мозку інтактних щурів при введенні оцтовокислого цинку

1 – контроль;
1-4 – 1-й- 4-й тиждень введення цинку оцтовокислого.
** – p ≤0,05 порівняно з показниками тварин контрольної групи*

При застосуванні оцтовокислого цинку активність індуцибельної форми NO- синтази також перевищувала контрольні показники в усі терміни досліджень на 83%, 50%, 85% та 16% відповідно (рис.3).

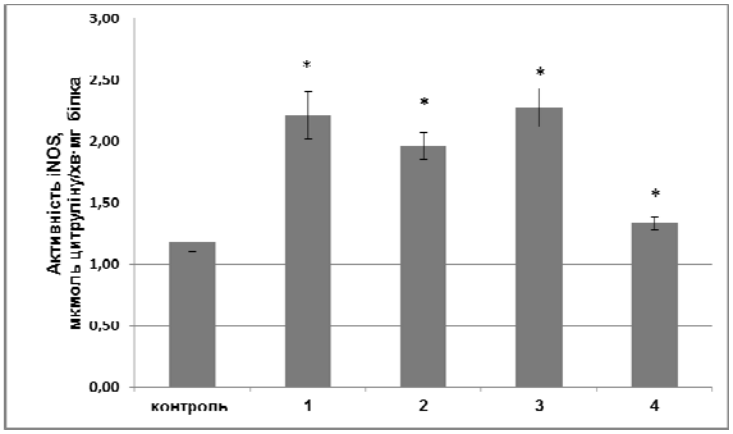

Рис. 3. Активність iNOS клітин мозку інтактних щурів при введенні оцтовокислого цинку

1 – контроль;

2 – 1-4 тиждень введення цинку оцтовокислого.

** – p ≤0,05 порівняно з показниками тварин контрольної групи*

Встановлена нами активація NO-синтази клітин мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю може відбуватись за рахунок індукції різних ізоформ ферменту: iNOS (індуцибельна NO-синтаза), яка продукує значно більше NO• у порівнянні з eNOS (ендотеліальна NO-синтаза) чи nNOS (нейрональна NO-синтаза). Відомо, що за умов запалення експресується індуцибельна форма NO-синтази. Існуючі на сьогодні літературні дані щодо впливу етанолу на активність NO-синтази клітин мозку щурів є неоднозначними. Відомо, що експресія iNOS запускається цитокінами та факторами росту і пов'язана із розвитком процесів запалення. Рядом дослідників було показано, що за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації відбувається зростання вмісту IL1 та IL6 і посилюється цитокін-індукована експресія iNOS астроцитів [17]. Продемонстровано дозозалежний характер впливу етанолу на активність iNOS гліальних клітин *in vitro*: зростання активності ферменту при введенні низьких доз спирту та зниження при високих дозах. З іншого боку, при гострому введенні етанолу показано зниження поліI:C-індукованої NO-відповіді у мікроглії. Вважається, що ефект етанолу на iNOS мРНК відбувається не через накопичення ацетальдегіду і ацетату, а через інгібування ядерного транскрипційного фактора (NF-kB) і STAT-1 сигнальної системи [18].

Окрім того, порушення гомеостазу цинку ряд авторів пов'язує з порушеннями метаболізму металотіонеіну III, який залучений до розвитку запальних процесів в мозку [16].

Тому наступним етапом нашого дослідження було визначення активності індуцибельної форми синтази оксиду азоту в мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю.

Нами встановлено, що на 4 тиждень в мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю активність iNOS досягала максимальних значень і була вище контрольних показників на 280% (рис. 4). З 5-го по 8-й тиждень активність ферменту знижувалась, та на 8 тиждень експерименту була нижче контролю. Застосування оцтовокислого цинку на початкових етапах досліджень (1 тиждень) призводило до зниження активності iNOS на 30%, у порівнянні з групою тварин із сформованою алкогольною залежністю. В подальші терміни дослідженнь (2-4 тижні) активність ферменту зростала і на 4 тиждень перевищувала контрольні показники на 28% і на 230% відповідно в порівнянні з групою тварин, які постійно вживали алкоголь.

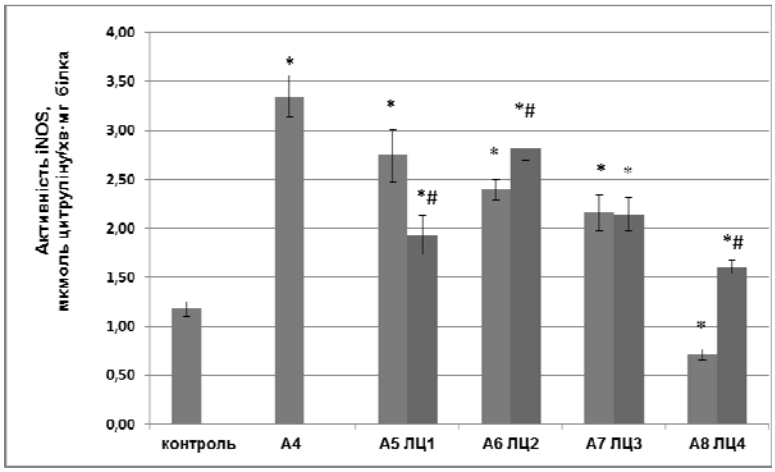

Рис. 4. Активність iNOS клітин мозку щурів при введенні оцтовокислого цинку за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації

1 – контроль;

А4-А8 – 4-8 тижні хронічної алкоголізації;

ЛЦ1-ЛЦ4 – введення оцтовокислого цинку на 5-8 тиждень хронічної алкоголізації.

** – p ≤0,05 порівняно з показниками тварин контрольної групи*

 # – p ≤ 0,05 порівняно з показниками тварин експериментальної моделі

Отже, встановлене нами зростання загальної активності NO-синтази клітин мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю відбувалось за рахунок індукції iNOS. У подальшому накопичення вмісту оксиду азоту у цих клітинах може бути одним із факторів посилення токсичної дії етанолу, який реалізується шляхом вторинного утворення токсичних аніон-радикалів та пероксинітритів.

Висновок

Таким чином, нами продемонстровано зростання активності NO-синтази у клітинах мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю. Однак, застосування оцтовокислого цинку за досліджуваної патології хоча і знижувало, але не призводило до нормалізації активності NO-синтази до контрольних величин. Це може бути пов'язано із впливом цинку на експресією iNOS, яка вносить основний вклад в загальну активність NO-синтази. Отримані результати свідчать на користь можливого використання досліджуваної сполуки для корекції метаболічних порушень, викликаних хронічним надходженням етанолу.

Список використаних джерел

1. Fadda F., Rossetti Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. //Prog. Neurobiol.1998; 56(4):p.385–431.

2.Морозов Ю.Е. Судебно-медицинское значение продуктов ферментативного окисления этанола в головном мозге трупов // Судебно-медицинская експертиза, 2002. – Т 45, № 1. – С. 17–21.

3. Викторов И.В.Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мезга//Вестник Российской Академии медицинских наук, 2000. – N 4. – С.5-10.

4. Скальная М.Г., Нотова С.В. Макро-микроэлементы в питании современного человека: Эколого-физиологические и социальные аспекты. – М.: "РОСМЭМ", 2004. – 310 с.

5. Харченко О.І., Чайка В.О., Богун Л.І., Ковальова В.А., Остапченко Л.І. Вплив оцтовокислого цинку на фосфоліпідний склад плазматичних мембран різних органів щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації // Фізика живого. – Т.17, №2. – 2009. – С.134-136.

6. Гуртовенко В. М., Проскурякова Т. В., Шумалов И. Н., Кудрявцев Р. В. Влияние цинка на показатели окисления и характер потребления этанола при алкогольной интоксикации в эксперименте // Патол. физиол. и экспер. терапия. – 1988. – №2. – С. 58–61.

7. Харченко Н.К. Роль изменений функциональной активности катехоламиновой и опиатной систем в механизме формирования и развития алкогольной зависимости // Архив психиатрии. – 1998. – №1(16). – с.123-128.

8.Ещенко Ю.А.Вміст цинку в клітинах при різних функціональних станах інсулярного апарата підшлункової залози: автореф.дис.на здобуття наук.ступеня канд..біол.наук: спец. 03.00.13 "Фізіологія людини і тварин". – Київ, 2004. – 19 с.

9. Salter M. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+}-dependent and Ca^{2+}-independent nitric oxide synthases / Mark Salter, Richard G. Knowles, Salvador Moncada // FEBS Letters. – 1991. – Vol. 291, № 1. – P. 145–149.

10. Increased activity and expression of Ca^{2+}-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / So Yeon Chin, Kailash N. Pandey, Shang-Jin Shi [et al.] // American Journal of Physiology. Renal Physiology. – 1999. – Vol. 277, № 5. – P. F797–F804.

11. Davis R. L. Acute ethanol exposure modulates expression of inducible nitric-oxide synthase in human astroglia: evidence for a transcriptional mechanism / Davis R. L., Syapin P. J. // Alcohol. – 2004. – V. 32. – P. 195–202.

12.The neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol / [Spanagel R., Siegmund S., Cowen M. et al.] // J Neurosci. – 2002. – V. 22. – P. 8676–8683.

13. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase / [Huiying Li, Raman C.X., Charles B. Glaser et al.] // J Biol Chem. – 1999. – V. 23, №274(30). – P. 21276–21284.

14. Lieber C. S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases // Adv Pharmacol. – 1997. – V. 38. – P. 601–628.

15. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center / [Raman C.S., Li H., Martásek P. et al.] // Cell. – 1998. – V. 95. – P. 939.

16. Eugenio Mocchegiania. Zinc-bound metallothioneins and immune plasticity: lessons from very old mice and humans // Immun Ageing. – 2007. – №2. – P. 4-7.

17. Syapin P. J. Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain // Alcohol. – 1998. – V. 16. – P. 159–165.

18. Greenberg S. Ethanol metabolism is not required for inhibition of LPS- stimulated transcription of inducible nitric oxide synthase // Alcohol. – 1999. – V. 17. – P. 203–213.

Надійшла до редколегії 07.07.14

Ю. Омельченко, асп, О. Сокур, д-р биол. наук., Л. Остапченко, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗЫ МОЗГА КРЫС ИЗ СФОРМИРОВАНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ УКСУСНОКИСЛОГО ЦИНКА

Изучено влияние уксуснокислого цинка на общую активность NO-синтазы и iNO-синтазы в клетках головного мозга крыс с сформированой алкогольной зависимостью. Выявлена индукция NO-синтазы за счет ее индуцибельной изоформы в экспериментальной группе крыс, которые постоянно употребляли алкоголь на протяжении 8 недель. Применение уксуснокислого цинка не приводило к полной нормализации активности фермента, что может быть связано с преимущественным влиянием цинка на экспрессию iNOS.

Ключевые слова: NO-синтаза, мозг, уксуснокислый цинк, алкогольная зависимость.

Yu. Omelchenko, PhD stud., O. Sokur, DSc., L. Ostapchenko, DSc
Taras Shevchenco national university of Kyiv

ACTIVITY NO-SYNTHASE RAT BRAIN FROM FORMATION OF ALCOHOL DEPENDENCE UNDER INTRODUCTION ACETATE ZINC

The effect of zinc acetate on the overall activity of NO-synthase and iNO synthase in the brain cells of rats with the formed alcohol dependence was studied (investigated). The induction of NO-synthase due to its inducible isoform in the experimental group of rats that constantly drank alcohol for 8 weeks was revealed. Zinc acetate using did not lead to the normalization of enzyme activity, which may be associated with a zinc predominant influence on the expression of the iNOS.

Key words: NO-synthase, brain, zinc acetate, alcohol dependence.