

© І.В. Якубцова, Т.Д. Хілько, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

УДК 577.175.73:616.33:616.34

І.В. Якубцова, Т.Д. Хілько, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

ПОРІВНЯННЯ АКТИВНОСТІ МЕМБРАНОВ'ЯЗАНИХ ФЕРМЕНТІВ КЛІТИН СЛИЗОВИХ ШЛУНКА ТА ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ВИРАЗКИ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Робота виконується в рамках НДР «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій», № держреєстрації 0111U004648.

Вступ. В організмі функціонує складна система біохімічної адаптації, яка формує певний рівень толерантності організму до стресових факторів [13, 5, 9]. Одним із ефективних механізмів забезпечення адаптації до агресивних факторів середовища є перебудова мембран і субклітинних структур клітин. Відомо, що продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), фосфоліпідний склад і мікроелементне оточення впливають на структуру і функції плазматичних мембран (ПМ) [12, 14], це відповідно впливає на метаболічно-адаптивний статус клітини. Дослідження активності мембранозв'язаних ферментів (5'-нуклеотидази, Na⁺,K⁺-АТФази, Ca²⁺,Mg²⁺-АТФази) є актуальним для оцінки функціонального стану мембран. Зміна стану мембрани за умов патологічного процесу є важливим регуляторним чинником каталітичної активності ферментів, асоційованих з мембранами [11]. Сьогодні остаточно не з'ясована роль мембранозв'язаних ферментів ПМ клітин слизової шлунка і дванадцятипалої кишки (ДПК) при утворенні виразки, а також не досліджений взаємний вплив виразкоутворення в одному з цих органів на інший відділ шлунково-кишкового тракту.

Метою роботи було дослідити та порівняти активність мембранозв'язаних ферментів у фракції ПМ клітин слизової оболонки за умов стресової виразки шлунка та цистеамінової виразки дванадцятипалої кишки.

Об'єкт і методи дослідження. Постановка експериментів відповідала міжнародним біоетичним принципам експериментів на тваринах, міжнародним угодам та національному законодавству у цій галузі. Для отримання нейродистрофічних уражень шлунка було застосовано модель іммобілізаційного стресу [2]. Виразки ДПК викликали пероральним введенням цистеаміну у дозі 30 мг/100 г двічі на день з інтервалом в 4 години [15]. Дослідження проводили на нелінійних щурах самцях, масою 220-240г. Тварин утримували в умовах стандартного раціону віварію. За добу до проведення дослідів щури мали доступ лише до води. Тварин розподіляли на три групи: 1 - контрольна, 2 – група тварин, у яких моделювали стресову виразку шлунка, 3-група тварин, у яких моделювали цистеамінову виразку ДПК. Розвиток виразок контролювали гістологічними дослідженнями. Фракцію плазматичних мембран

одержували як описано [3]. 5'-нуклеотидазну, Ca²⁺, Mg²⁺-АТФазну, Na⁺, K⁺-АТФазну активність проводили за методами описаними [4]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики на основі 10-12 повторів (M±m, n=10-12) [1]. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. ПМ приймають участь у підтриманні клітинної цілісності, виконують ряд різноманітних функцій в клітині, які забезпечують життєдіяльність та формування адаптивних реакцій клітин у відповідь на несприятливі впливи. Функціональна активність ПМ значною мірою визначається станом білкової складової в їх структурі, зокрема, активністю мембранозв'язаних ферментів. Проведені дослідження показали, що вже на першу добу після іммобілізаційного стресу у фракції ПМ клітин СО шлунка щурів відбувалось зниження Ca²⁺, Mg²⁺-АТФазної, Na⁺, K⁺-АТФазної, та 5'-нуклеотидазної активності порівняно з показниками контрольної групи (**табл.**). Зниження активності мембранозв'язаних ферментів може бути наслідком утворення активних форм кисню та активації процесів ПОЛ, які відбуваються за умов виразкоутворення. В попередніх роботах [12, 14] встановлено, що накопичення продуктів ПОЛ може здійснювати безпосередній вплив на білкові компоненти мембран шляхом окиснення SH-груп, а також викликати можливі порушення білок-ліпідних взаємодій і утворення міжмолекулярних "зшивок" поліпептидних ланцюгів [10]. Відомо, що дисбаланс у системі ПОЛ змінює функціональні параметри клітинних мембран, зокрема, транспортних АТФаз [12, 16].

Встановлено, що Na⁺, K⁺-АТФазна активність фракції ПМ клітин слизової оболонки досліджуваних органів змінювалась по-різному. За умов обох моделей виразкоутворення у шлунку активність Na⁺, K⁺-АТФази знижувалась: при дії цистеаміну у 1,4 раза, стресу у 2,5 раза. Активність ферменту зростала у дванадцятипалій кишці за дії цистеаміну у 2 рази, стресу у 1,7 раза. Очевидно, зміни АТФ-азної активності в значній мірі обумовлені дезорієнтацією ліпідного мікрооточення і порушенням конформаційної стабільності молекулярних комплексів ферментів [10, 16]. Полярні продукти ПОЛ можуть мати пряму пошкодуючу дію на сульфгідрильні групи ферменту, інактивуючи каталітичні і алостеричні центри Na⁺, K⁺-АТФ-азного комплексу [7]. Оскільки Na⁺, K⁺-АТФаза формує іонні градієнти, які забезпечують

Активність мембранозв'язаних ферментів (мкмоль Фн/мг білка Чхв.) фракції ПМ слизової оболонки шлунка та ДПК за умов експериментального ульцерогенезу у щурів (M±m; n=12)

Групи тварин	5' нуклеотидаза	Na ⁺ , K ⁺ АТФаза	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ АТФаза
Контроль шлунок	3152,8±91,5	460,2±12,8	242,3±7,1
Стрес шлунок	1659,4±45,7*	184,1±9,4*	153,6±2,4*
Цистеамін шлунок	2252,0±57,6*	328,7±7,7*	186,3±4,9*
Контроль ДПК	2751,3±72,5	322,1±7,1	181,7±4,3
Стрес ДПК	2130,7±53,9*	547,7±12,3*	272,5±8,1*
Цистеамін ДПК	1310,2±29,3*	643,2±11,4*	79,0±2,1*

Примітка: * – p<0,05 – достовірно у відношенні до контролю.

енергетично найважливіші прояви життєдіяльності, зниження її активності може призвести до порушень адаптивного потенціалу як клітин шлунка, так і клітин ДПК. Встановлено, що за умов розвитку як стресової, так і цистеамінової виразки 5'-нуклеотидазна активність у фракції ПМ клітин слизової оболонки шлунка та ДПК знижувалась. Зниження активності ферменту можна розглядати як один із проявів компенсаторно-приспосувальної реакції організму, направленої на обмеження дії ульцерогенного чинника. Це відповідає раніше висунутій гіпотезі про механізми протишлущової і аденолітичної дії важливого продукту 5'-нуклеотидазної реакції – аденозину за умов стресового пошкодження міокарду [6]. Припускають, що компенсаторна зміна кількості аденозину реалізується на рівні всього організму і є універсальним механізмом саморегуляції при будь-яких екстремальних взаємодіях. Ca²⁺, Mg²⁺-АТФаза активність (PMCA) за умов стресової та цистеамінової виразки змінювалась по-різному: у шлунку відбувалося її зниження у 1,6 раза, тоді як у ДПК збільшення у 1,5 раза. За умов цистеамінової виразки у слизовій оболонці обох досліджуваних органів Ca²⁺, Mg²⁺-АТФаза активність зменшувалась, відповідно у 2,3 та 1,6 раза. Зниження Ca²⁺, Mg²⁺-АТФаза активності при даних моделях може бути пов'язано з порушенням Ca²⁺ гомеостазу та можливо з початком апоптичних змін у клітинах СО шлунка та ДПК. Зростання рівня іонів Ca²⁺ є результатом зниження активності PMCA, є одним з факторів, які беруть участь у стресових дистрофіях тканин, а також при запальних процесах і некротичних змінах слизової оболонки шлунка на пізніх етапах розвитку виразкової хвороби. Останнім часом з'являються дані про важливу роль [Ca]²⁺ на ранніх етапах розвитку патології як

регулятора активності протонної помпи, зокрема, і кислотної секреції в цілому [8]. Тривале підвищення рівня Ca²⁺ в цитоплазмі (від 10⁻⁷ до 10⁻⁵ М і вище) призводить до загибелі клітин. Можливо зниження активності PMCA може призводити до затримки транспорту іону з клітини, що супроводжується накопиченням [Ca]²⁺, який є регулятором роботи протонної помпи. Встановлені нами зміни активності мембранозв'язаних ферментів фракції ПМ клітин слизових свідчать про порушення транспортних властивостей клітинних мембран в умовах розвитку експериментальних виразок шлунку та ДПК. Ступінь ураження досліджуваних ферментативних систем у шлунку та у ДПК неоднакова, що може вказувати на залучення різних внутрішньо молекулярних механізмів в розвиток процесів, що відбуваються за умов роботи різних моделей.

Висновки. Встановлено, що за умов стресової та цистеамінової моделі виразки активності Ca²⁺,Mg²⁺-АТФази, Na⁺, K⁺-АТФази, 5'- нуклеотидази знижувались у шлунку. За умов стресової виразки у дванадцятипалій кишці активності Ca²⁺,Mg²⁺-АТФази, Na⁺, K⁺-АТФази зростали, а 5'- нуклеотидази -знижувалась. За умов цистеамінової виразки у дванадцятипалій кишці активності Ca²⁺,Mg²⁺-АТФази, 5'- нуклеотидази знижувались, а активність Na⁺, K⁺-АТФази збільшувалась.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення активності мембранозв'язаних ферментів у фракції ПМ клітин слизової оболонки за умов стресової виразки шлунка та цистеамінової виразки дванадцятипалої кишки є доцільним для прогнозування розвитку виразкової хвороби, дозволить більш повно зрозуміти процеси, що відбуваються при комбінованих виразках шлунка і ДПК.

Список літератури

1. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений / З. Брандт. - М. : Мир, 1975. - 184 с.
2. Гройсман С. Д. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс / С.Д. Гройсман Т.Г. Каревина // Деп. в ВИНТИ. - 1979. - №3. - С. 19-24.
3. Древал В. И. Ізолювання препаратів плазматичної мембрани клітин слизової оболонки шлунка / Древал В. И. [и др.] // Укр. биох. журн. - 1989. - Т.61, № 2. - С. 37-40.
4. Рибальченко В.К. Структура і функції мембран / В.К. Рибальченко, М.М. Коганов / Практикум. - К., 1988. - 204 с.
5. Bhatia V. Stress and the gastrointestinal tract / V.Bhatia, R.K. Tandon // Gastroenterol. Hepatol. - 2005. - Vol.20, № 3. - P. 332-339.
6. Borowiec A. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases / A. Borowiec, K. Lechward [et al.] // Acta Biochim. Pol. - 2006. - Vol.53, № 2. - P. 269-278.
7. Delamere N.A. Lens ion transport: from basic concepts to regulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity / N.A. Delamere, S. Tamiya // Exp. Eye. Res. - 2009. - Vol.88, № 2. - P. 140-143.

8. Di Leva F. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation / F. Di Leva, T. Domi, L. Fedrizzi, D. Lim // Arch. Biochem. Biophys. – 2008. – Vol.476, № 1. – P. 65–74.
9. Drozdowski L. Intestinal mucosal adaptation / L. Drozdowski, A.B. Thomson // World. J. Gastroenterol. – 2006. – Vol.12, № 29. – P. 4614–4627.
10. Fuertes G. Role of membrane lipids for the activity of pore forming peptides and proteins / G. Fuertes, D. Gimenez [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2010. – Vol.677, № 2. – P. 31–55.
11. Hulbert A. A Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals / A. Hulbert [et al.] // Physiol. Rev. – 2007. – Vol.87, № 4. – P. 1175–1213.
12. Karageuzyan K.G. Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment / K.G. Karageuzyan // Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. – 2005. – Vol.4, № 1. – P. 85–98.
13. Konturek P.C. Physiological, immunohistochemical and molecular aspects of gastric adaptation to stress, aspirin and to H. pylori-derived gastrotaxins / P.C. Konturek // J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – Vol.48, № 1. – P. 3–42.
14. Leitinger N. The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans / N. Leitinger // Subcell. Biochem. – 2008. – Vol.49. – P. 325–350.
15. Robert A. Cysteamine-induced duodenal ulcers: a new model to test antiulcer agents / A. Robert, J.E. Nezamis [et al.] // Digestion. – 1974. – Vol.11, № 3–4. – P. 199–214.
16. Zhang L. Na⁺, K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺, K⁺-ATPase regulation / L. Zhang, Z. Zhang, H. Guo [et al.] // Fundam. Clin. Pharmacol. – 2008. – Vol.22, № 6. – P. 615–621.

УДК 577.175.73:616.33:616.34

ПОРІВНЯННЯ АКТИВНОСТІ МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНИХ ФЕРМЕНТІВ КЛІТИН СЛИЗОВИХ ШЛУНКА ТА ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ВИРАЗКИ

Якубцова І.В., Хілько Т.Д., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.

Резюме. Проведено порівняльну оцінку активності мембранозв'язаних ферментів (5'-нуклеотидази, Na⁺,K⁺-АТФази, Ca²⁺,Mg²⁺-АТФази) плазматичних мембран клітин слизових оболонок шлунка та дванадцятипалої кишки в нормі та за умов моделювання виразок у щурів.

Ключові слова: гостра стресова виразка шлунка, цистеамінова виразка дванадцятипалої кишки, активність мембранозв'язаних ферментів.

УДК 577.175.73:616.33:616.34

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОК СЛИЗИСТЫХ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЯЗВЫ

Якубцова И.В., Хилько Т.Д., Преображенская Т.Д., Остапченко Л.И.

Резюме. Проведена сравнительная оценка активности мембраносвязанных ферментов (5'-нуклеотидазы, Na⁺,K⁺-АТФаза, Ca²⁺,Mg²⁺-АТФаза) плазматических мембран клеток слизистых оболочек желудка и двенадцатиперстной кишки в норме и в условиях моделирования язвообразования у крыс.

Ключевые слова: острая стрессовая язва желудка, цистеаминовая язва двенадцатиперстной кишки, активность мембраносвязанных ферментов.

UDC 577.175.73:616.33:616.34

Comparison Of Activity Of Membrane Bounded Enzymes Of Gastric And Duodenum Mucosa Cells At The Modeling Of Ulcers

I.V. Yakubtsova, T.D. Khilko, T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko

Summary. Comparative evaluation of 5'-nucleotidase, Na⁺,K⁺-ATPase, Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase of plasma membranes of stomach and duodenum in the normal and at the conditions of experimental ulcers in rats was carried out.

Key words: stress gastric ulcer, cysteamine duodenal ulcer, membrane bounded enzymes.

Стаття надійшла 22.11.2011 р.