

УДК 577.391:311

О. Кравченко, асп., Л. Гавриш, канд. біол. наук,
Ю. Степанов, канд. біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ Na^+ , K^+ -АТФАЗИ, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФАЗИ ТА 5'-НУКЛЕОТИДАЗИ В МЕМБРАННИХ ПРЕПАРАТАХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Досліджено активність мембранозв'язаних ферментів в динаміці розвитку виразкового коліту. Встановлено підвищення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази та 5'-нуклеотидази в плазматичних мембранах колоноцитів щурів при запаленні в товстій кишці. Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази мали різнонаправлений характер і статистично не відрізнялись від контролю.

The activities of membrane enzymes under inflammation bowel disease (colitis) were investigated. The Ca^{2+} , Mg^{2+} – ATPase and the 5'-nucleotidase activities increase in rat colonocytes membrane under colitis were determined. The statistical changes of Na^+ , K^+ ATPase activity during colitis development were not established.

Вступ. Виразковий коліт (ВК) – це хронічний запальний процес з дистрофічними та атрофічними деструктивними змінами слизової оболонки товстої кишки, що супроводжується порушеннями її секреторних і моторних функцій. До патогенезу вищезазначеного захворювання залучений цілий комплекс чинників, таких як психо-емоційний стрес, генетичні, імунні, біохімічні, порушення складу мікрофлори кишківника. Запальні процеси, які виникають при ВК характеризуються сукупністю біохімічних змін, в тому числі окисно-відновних процесів, і, в першу чергу, підвищенням інтенсивності процесів вільнорадикального окислення ліпідів (ВОЛ) на фоні зниження функціональних можливостей антиоксидантної системи. Активація процесів ВОЛ супроводжується тканинною гіпоксією внаслідок зниження регіонального кровотоку та мікроциркуляції. Продукти ВОЛ, що мають цитотоксичну та антимітотичну дію, уражують мембрани клітин кишківника, викликаючи зміни їх проникності та структурно-функціональної цілісності, що, в свою чергу, спричинює розвиток некрозів і виникнення виразок у товстій кишці. Деструкція плазматичних мембран клітин слизової оболонки кишківника призводить до порушень ліпідно-білкової складової (зміни вмісту фосфоліпідних компонентів та активності мембранозв'язаних ферментів, таких як Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза та 5'-нуклеотидаза) [1, 2, 3].

Метою роботи було визначити активність Na^+ , K^+ -АТФази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази та 5'-нуклеотидази в плазматичних мембранах клітин слизової оболонки товстої кишки щурів на різних етапах розвитку експериментального виразкового коліту.

Об'єкти й методи дослідження. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно Європейської конвенції.

Експерименти проводились на нелінійних білих щурах самцях масою 180–230 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення дослідів щури мали доступ лише до води. Тварин розподіляли на групи: 1 – контрольна (10 шт.), 2, 3, 4 – групи, у яких моделювали виразковий коліт (по 10 щурів у групі). Модель експериментального виразкового коліту створювали за методичними рекомендаціями [6]. Щурів 2-ї групи декапітували через 24 год, 3-ї та 4-ї – через 3 і 6 діб, відповідно, після введення кислоти.

Клітини товстої кишки виділяли за допомогою осмотичного методу [9]. Отримані колоноцити піддавали гомогенізації в трис- HCl буфері ($\text{pH}=7,4$) у співвідношенні 1:5. Фракцію плазматичних мембран (102000 g) отримували на градієнті сахарози (26%) відповідно до рекомендацій [5]. В отриманих мембранах визначали активність Na^+ , K^+ -АТФази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази та 5'-нуклеотидази по кількості відщепленого фосфору за методами [2]. Активність ферментів виражали у мкмольх неорганічного фо-

сфору на мг білку за хвилину. Визначення концентрації білку здійснювали за методом Бредфорд.

Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Слизовій оболонці товстої кишки притаманна фізіологічна здатність до швидкого відновлення завдяки балансу між проліферацією і апоптозом клітин, а також після ушкодження. Дослідження морфофункціональних змін у процесі запалення та на ранніх етапах загоєння виразкових уражень є важливим напрямком для визначення динаміки відновлення слизової оболонки товстої кишки.

Згідно візуальних макроскопічних досліджень на 1-шу добу після ініціації виразкового коліту нами встановлено типові гострі ерозивно-запальні ушкодження слизової оболонки, що супроводжуються характерними симптомами коліту, до яких належить діарея та домішки крові у випорожненнях. На 3-ю добу процес виразкоутворення триває, однак намічається тенденція до зменшення патологічних проявів. Лише на 6-ту добу в зоні виразкового дефекту спостерігаються ознаки загоєння, а в деяких випадках і повного невелиювання запальних явищ на фоні зникнення патологічних симптомів.

Оскільки досліджувані маркерні ферменти є інтегральними білками, їх активність значною мірою залежить від стану оточуючого ліпідного матриксу. У зв'язку з цим велике значення для проведення експериментів має чистота, везикулюваність та орієнтація виділених мембранних препаратів. Таким чином, вивчення активності Na^+ , K^+ -АТФази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази та 5'-нуклеотидази дозволить судити не лише про функціональний стан вищезазначених ферментів, а і про стан оточуючих їх мембранних компонентів.

5'-нуклеотидаза (5'-АМФаза, АМФ-фосфатаза) присутня у більшості клітинах ссавців і включає в себе групу споріднених ферментів, що каталізують гідролітичне дефосфорилювання у 5-ому положенні пентози нуклеозидфосфатів і дезоксинуклеозидфосфатів, та різняться за субстратною специфічністю, молекулярною вагою, локалізацією, кінетичними і регуляторними властивостями. Розрізняють мембранозв'язану та цитозольну форми 5'-АМФаз. Останні в невеликих кількостях присутні у мікросомах, мітохондріях, ядрах та лізосомах. 5'-нуклеотидаза – фосфогідролаза, що є специфічною для всієї молекули субстрату, на відміну від деяких інших фосфатаз, які виявляють свою специфічність лише щодо фосфатної групи. Слід зазначити, що активність ферменту повністю залежить від присутності іонів Mg^{2+} . Інтенсивно досліджується роль даного ферменту за різноманітних патологій. На сьогодні зміни активності ферменту використовуються як діагностичний та прогностичний тест при захворюваннях шлунка, печінки та жовчних шляхів [3]. Особливо цікавим є вивчення згаданих процесів у плазматичних мембранах клітин сли-

зової оболонки товстої кишки на різних етапах розвитку експериментального виразкового коліту.

Дослідження активності 5'-нуклеотидази виявили характерні однонаправлені зміни у функціонуванні зазначеного ферменту мембран колоноцитів при експериментальному виразковому коліті (див. таб.). На 1-у добу після ініціації запалення у товстій кишці спостерігається статистично достовірне зниження активності 5'-АМФази

на 26% від контролю. В наступні періоди спостереження виявлено поступове зростання активності досліджуваного ензиму. Так, на 3-ю добу активність 5'-нуклеотидази складає 86% від контролю, а на 6-ту – 90%. Різке зниження активності даного ферменту на початкових етапах гострого запалення кишечника, можливо, пов'язано зі зміною структури мембран, зокрема з порушенням взаємодії її білкових компонентів і фосфоліпідів.

Активність Na^+ , K^+ -АТФази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази та 5'-нуклеотидази в плазматичних мембранах клітин слизової оболонки товстої кишки за експериментального виразкового коліту

Група тварин	5'-нуклеотидаза мкмоль/мг хв	Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза мкмоль/мг хв	Na^+ , K^+ -АТФаза мкмоль/мг хв
контроль	280,2±22,6	51,6±2,2	1,113±0,121
1-ша доба коліту	206,6±31,5*	66,7±2,5*	0,947±0,117
3-тя доба коліту	242,1±24,7	65,4±2,7*	1,015±0,111
6-та доба коліту	251,4±27,7	64,1±3,6	0,929±0,085

* – різниця з контролем достовірна ($p < 0,05$)

Іонний склад клітин (допоки вони проявляють властивості живого) значною мірою відрізняється від іонного складу оточуючого середовища. Так, в цитоплазмі клітин концентрація іонів кальцію складає приблизно 50-100 нМ, тоді як в оточуючому середовищі міститься приблизно 3 мМ Ca^{2+} . Підтримує таку різницю концентрацій система активного транспорту іонів кальцію, головну роль в якій відіграє кальцієвий "насос" – фермент Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза. Цей фермент не є специфічним мембранним маркером, оскільки транспортування кальцію може здійснюватись і до внутрішньоклітинного депо – ендоплазматичного ретикулума. Підтримка низької концентрації іонів кальцію в цитоплазмі клітин забезпечує можливість регуляції клітинних функцій шляхом збільшення проникності клітинних мембран для Ca^{2+} : потрапляючи до клітини ці іони активують велику кількість різноманітних клітинних реакцій (скорочення та активацію сигнальних каскадів) [4]. Слід відмітити, що іонна асиметрія, сформована на мембрані, є вкрай необхідною для забезпечення клітинного метаболізму. Це головним чином стосується клітин товстого кишечника, основною фізіологічною функцією яких є реабсорбція води, деяких іонів, глюкози та коротколанцюгових жирних кислот. Таким чином, забезпечуючи виведення надлишку іонів кальцію з клітини Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза тим самим підтримує його концентрацію на фізіологічному рівні і забезпечує перебіг нормальних метаболічних процесів та функцій клітин.

Дослідження активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази за умов розвитку виразкового коліту також виявили характерні зміни у функціонуванні зазначеного ферменту мембран колоноцитів. Так, на першу добу після моделювання виразкового коліту спостерігається статистично достовірне підвищення активності досліджуваного ензиму на 30%, а на 3-тю – 6-ту добу відмічено незначне зниження його активності. Не дивлячись на те, що в більшості випадків у кінцевий період спостереження розвитку патології візуальних ушкоджень слизової оболонки практично не виявлено, активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази перевищує контроль на 24%. Установлені факти можуть бути пов'язані із порушеннями кальцієвого гомеостазу і, можливо, з початком апоптичних або некротичних змін у клітинах слизової оболонки товстої кишки.

Na^+ , K^+ -АТФаза – трансмембранний білок плазматичних мембран, котрий здійснює перенос іонів Na^+ і K^+ через мембрану проти електрохімічного градієнту, забезпечуючи таким чином рушійну силу для різноманітних Na^+ і K^+ -залежних транспортних систем. Асиметричний розподіл одновалентних катіонів є необхідним не лише для формування мембранного потенціалу клітини, а і для транспорту метаболітів через клітинну мем-

брану, що є однією з основних функцій колоноцитів, та для регуляції внутрішньоклітинних реакцій обміну речовин. Завдяки своїй фундаментальній ролі у клітинному метаболізмі, активність Na^+ , K^+ -АТФази регулюється за допомогою досить складних механізмів, які найчастіше реалізуються за допомогою білок-білкових взаємодій, крім цього чималу роль у функціонуванні даного ферменту відіграє й ліпідне оточення [1].

За умов досліджуваної патології статистично достовірних змін активності Na^+ , K^+ -АТФази виявити не вдалося (див. таб.). Ці дані дають підстави передбачити, що функціонування регуляторних механізмів справляє компенсаторний вплив на зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази, викликані запальними процесами у слизовій оболонці товстої кишки. Слід також відмітити, що Na^+ і K^+ разом із Cl^- та HCO_3^- є основними осмотично активними іонами, які забезпечують нормальний метаболізм та фізіологічне функціонування колоноцитів [8]. Відтак, забезпечення сталої активності ферментів, які залучені до транспорту вищезазначених іонів є життєвоважливою функцією для клітин даного типу.

Висновки. Результати експериментальних досліджень дозволяють зробити висновок, що розвиток та ремісія виразкового коліту супроводжуються змінами активності маркерних мембранних ферментів (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази та 5'-нуклеотидази). Це дає підстави передбачити, що за умов запалення відбуваються зміни структурно-функціонального стану ферментів, які супроводжуються реорганізацією оточуючого їх мембранного матриксу клітин слизової оболонки товстої кишки, що в подальшому може призвести до модифікації транспортних і внутрішньоклітинних регуляторних систем.

1. Болдырев А.А. Na^+ / K^+ -АТФаза – свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4. – С. 2–9.
2. Древал В.И., Финаин А.В., Баранин Е.А. // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т. 61, № 2. 3. Ковальова В.А., Гаєриш Л.І., Скопенко О.В., Остапченко Л.І. Дослідження активності 5'-нуклеотидази та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази в мембранних препаратах клітин слизової оболонки шлунка за умов експериментальної моделі виразки // Вісник Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, серія Біологія. – 2004. – № 42–43. – С. 57–58. 4. Ткачук В.А. Мембранные рецепторы и внутриклеточный кальций // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – №1. – С. 10–153. 5. Рибальченко В.К., Коганов М. М. Структура и функции мембран. Практикум // Изд-во "Вища школа", 1988. 6. Fabia R., Willen R., ArRajab A. et al. Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis // Eur Surg Res. – 1992. – Vol. 24. – № 24. – P. 211–225. 7. Farrell R., Pappertory M. Ulcerative colitis // Lancet. – 2002. – Vol. 359. – № 5. – P. 97–110. 8. Kunzelmann K. and Mall M. Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease // Physiological Reviews. – 2002. – Vol. 82. – No. 1. – P. 245–289. 9. Roediger W.E.W., Truelove S.C. Methods of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies // Gut. – 1979. – Vol. 20. – P. 484–488.

Надійшла до редколегії 25.12.06