ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

1 • 2007

БІОХІМІЯ

УДК 616.33-002.44:539.1.047

© 2007

В. А. Ковальова, Л. І. Гавриш, Л. І. Остапченко

Активність протеїнкіназ у цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки

(Представлено академіком НАН України М. Є. Кучеренком)

The definition of the activity of protein kinases in cytosol of cells of mucosa under different experimental models of stomach ulcer has shown that only the activity of tyrosine kinase is increased. Thus, this enzyme is a sensitive link in the cascade of biochemical reactions under the development of the given pathological process.

Вплив на організм тварин і людини несприятливих факторів призводить до виникнення різних патологій, зокрема в системі травлення. Найбільш поширеною серед останніх є виразка шлунка, що являє собою кінцевий етап захворювання, у патогенезі якого беруть участь центральна нервова та ендокринна системи, зміни в яких активують місцеві агресивні фактори. Через свою поширеність виразкова хвороба є предметом всебічного вивчення. Сьогодні велика увага приділяється з'ясуванню біохімічних механізмів виникнення і розвитку даної патології.

Виникнення виразкової хвороби обумовлюють ряд етіологічних факторів та включення у певній послідовності складних багатокомпонентних систем, що здатні контролювати утворення та розвиток цієї патології. Важливим регуляторним механізмом, що істотно впливає на перебіг внутрішньоклітинних подій, пов'язаних з модифікацією білкових компонентів, є системи фосфорилювання, які представлені різноманітними протеїнкіназами. Процес фосфорилювання інтегрує своєю дією основні метаболічні шляхи, контролюючи транспорт іонів, активність регуляторних каскадів, експресію генів і, крім того, бере активну участь у реалізації великої кількості функціональних та патологічних відповідей клітини. Вивчення механізмів порушень функціонування систем фосфорилювання при різних патологічних станах організму є актуальним і важливим питанням сучасних наукових досліджень.

Метою нашого дослідження було визначити залучення системи протеїнкіназ цитозолю клітин слизової оболонки шлунка щурів у молекулярних механізмах розвитку експериментальної виразки.

Матеріали і методи. У дослідах використовували щурів лінії Вістар обох статей масою 130–150 г. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію, які за добу до проведення дослідів мали доступ лише до води.

З метою отримання нейродистрофічних уражень шлунка за моделлю іммобілізаційного стресу в модифікації С. Д. Гройсмана та Т. Г. Каревіної, так званого соціального стресу [1], щурів розміщували в металевих перфорованих патронах із скляним вікном у донній частині, де розміщується голова щура. Патрони з тваринами розміщували в колонії вільноживучих щурів, в яких створювали умови для їх природного існування (освітлення, вода, корм). Через 24 год щурів виймали з патронів та декапітували. Стан слизової оболонки шлунка досліджували за допомогою гастроскопа при трансілюмінаційному освітленні. Розраховували середню ураженість кожного шлунка та кількість щурів з ураженнями в кожній серії експериментів.

Етанолові виразки викликали за методом Окабе [2]. Для цього щурам per os вводили 1 мл етанолу в концентрації 80%.

Аспіринову експериментальну виразку шлунка викликали пероральним 5-разовим введенням аспірину в дозі 150 мг/кг протягом 3 діб як описано в роботі [3].

Ліпіди екстрагували хлороформ-метанольною сумішшю (2 : 1 за об'ємом) за допомогою модифікованого методу [4]. Для запобігання окиснення ліпідів у розчинники додавали антиоксидант іонол. Промиті й очищені від водорозчинних компонентів ліпідні екстракти зразків випарювали в атмосфері азоту, а потім розчиняли в 1 мл суміші хлороформ : метанол (1 : 1). Для вивчення якісного і кількісного складу нейтральних та полярних ліпідів застосовували метод тонкошарової хроматографії. Розділення ліпідів проводили на пластинках "Silica gel 60" ("Merk", Німеччина). Ідентифікацію індивідуальних ліпідів здійснювали за допомогою відповідних стандартів і високоспецифічного для фосфоліпідів реактиву Васьковського–Костецького.

Активність циклонуклеотидзалежних протеїнкіназ оцінювали за включенням $^{32}P_н$ в гістон Н2В. У випадку цАМФ- і цГМФ-залежних протеїнкіназ (ПК-А та ПК-Г) активність визначали при наявності і у відсутності відповідних циклонуклеотидів у концентрації 10^{-6} моль/л. Тривалість інкубації становила 5 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли на холоді з наступним нанесенням проб на диски з фільтрувального паперу "Filtrak FN-23". Висушені фільтри відмивали як описано в [5] у розчинах: 10%-на ТХО; 5%-на ТХО; етиловий спирт; ацетон. Радіоактивність визначали в толуольному сцинтиляторі ЖС-107, на лічильнику "Delta-300" (США). Питому активність ферментів виражали в пмоль $^{32}P_н$ за 1 хв на 1 мг білка [6].

Інкубаційне середовище для визначення активності Ca^{2+}, фосфоліпідзалежної протеїнкінази (ПК-С) в об'ємі 100 мкл містило: 25 мМ трис-HCl, pH 7,4; 10 мМ $MgCl_2$; 2 мМ ЕДТА; 1 мМ ЕГТА; $5{\cdot}10^{-5}$ моль/л Ca^{2+}; 0,1 мг/мл фосфатидилсерину; 1 мг/мл гістону H_2B; 0,2 мг/мл білка; $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (γ-^{32}Р/-АТФ) $((8 \div 10) \cdot 10^4$ Бк).

Визначення активності тирозинових протеїнкіназ (Тир-ПК) проводили за рекомендаціями [7]. Активність тирозинових протеїнкіназ оцінювали за включенням $^{32}P_н$ із (γ-^{32}Р/-АТФ) в ангіотензин II. Інкубаційне середовище для визначення протеїнкіназної активності в загальному об'ємі 50 мкл містило: 25 мМ трис-HCl, pH 7,4; 10 мМ $MgCl_2$; 1 мкМ Na_3VO_4; 2 мкМ білковий субстрат (ангіотензин II), ферментативний білок (2,5 мг/мл); $5{\cdot}10^{-5}$ моль/л (γ-^{32}Р/-АТФ) $((8 \div 10) \cdot 10^4$ Бк) в пробу. Проби інкубували 30 хв при 40 °С.

Результати та їх обговорення. Протеїнкінази є двосубстратними ферментами, що модифікують різноманітні білкові субстрати шляхом перенесення залишку фосфорної кислоти

від АТФ на певні залишки амінокислот (серин, треонін або тирозин) [8]. Фосфорилювання є важливим регуляторним механізмом, який координує функції основних месенджерних систем — аденілатциклазної і поліфосфоінозитидної, роботу життєво важливих алостеричних ферментів, насосів тощо [9]. Чітке узгодження метаболічних процесів на різних рівнях регуляції клітинної активності, яке здійснюється ферментами фосфорилювання, визначає багато закономірностей функціонування окремих клітин і організму в цілому, як у нормі, так і при різних патологічних станах [10].

Встановлені раніше істотні порушення мембран клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальних виразок дозволили передбачити можливі порушення у функціонуванні ферментів, регуляція яких тісно пов'язана з мембранними процесами і станом їх структурних компонентів.

Дослідження фосфоліпідного складу мембран клітин слизової оболонки шлунка щурів показали зниження вмісту всіх груп фосфоліпідів при всіх експериментальних моделях виразки (табл. 1). Найбільш статистично значуще зниження фосфоліпідів усіх груп спостерігалось при стресовій виразці — у два рази. Ліпіди не є інертними структурними компонентами мембран клітин, а відіграють ключову роль у регулюванні багатьох функцій клітин, тому що вони є попередниками біоактивних вторинних месенджерів, які утворюються по багатократних провідних шляхах трансдукції сигналу. Зменшення кількості головних фосфоліпідів: фосфатидилсерину і фосфатидилінозитолу, свідчить про зміни фосфоліпідної складової в структурі мембран, що зумовлює порушення функціонування регуляторних каскадів.

У цьому плані особливий інтерес викликає дослідження протеїнкіназ, активність яких регулюється різними чинниками — цАМФ, цГМФ, фосфоліпідами та кальцієм. Експериментальними дослідженнями показано, що системи серин-треонінового та тирозинового фосфорилювання мають різну чутливість до патологічного стану слизової шлунка за умов розвитку виразки. Згідно з отриманими результатами, при всіх експериментальних моделях виразки активність циклонуклеотид-, кальцій- та фосфоліпідзалежних протеїнкіназ змінювалась неістотно відносно контрольної групи тварин у цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів (табл. 2). Активність тирозинової кінази в цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів підвищувалась за умов усіх досліджуваних експериментальних моделей виразки: при аспіриновій — в 1,3 раза; при етаноловій та стресовій — в 1,5 раза відносно контрольної групи тварин.

Тирозинові протеїнкінази каталізують реакції перенесення фосфатних груп від АТФ на тирозинові залишки білкових субстратів. Підвищення активності ЕРФ-рецепторних тирозинових протеїнкіназ за умов усіх типів виразки може свідчити про виникнення порушень у взаємодії ЕРФ з його мембранними рецепторами. Крім того, виявлений ефект може бути

Таблиця 1. Вміст фосфоліпідів в плазматичних мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів при різних експериментальних моделях виразки, мкг/мг білка ($M \pm m$; $n = 10$)

Група тварин	Фосфатидил-холін	Фосфатидил-іноситол	Фосфатидил-серин	Фосфатидил-етаноламін
Контроль	$110{,}7 \pm 10{,}0$	$17{,}6 \pm 1{,}6$	$17{,}8 \pm 1{,}5$	$58{,}2 \pm 5{,}5$
Аспіринова модель	$59{,}2 \pm 5{,}8^*$	$11{,}8 \pm 1{,}0^*$	$13{,}2 \pm 1{,}2^*$	$41{,}6 \pm 4{,}9^*$
Етанолова модель	$62{,}7 \pm 5{,}8^*$	$14{,}5 \pm 1{,}3^*$	$13{,}0 \pm 1{,}0^*$	$26{,}9 \pm 2{,}0^*$
Стресова модель	$62{,}8 \pm 5{,}8^*$	$13{,}3 \pm 1{,}0^*$	$10{,}6 \pm 1{,}0^*$	$34{,}9 \pm 3{,}0^*$

$^*p < 0{,}05$ щодо контролю.

Таблиця 2. Активність протеїнкіназ у цитозолі клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки, пмоль $^{32}P_н/(хв \cdot мг\ білка)$ $(M \pm m;\ n = 10)$

Група тварин	ПК-А	ПК-Г	ПК-С	Тир-ПК
Контроль	$19{,}6 \pm 1{,}8$	$20{,}8 \pm 2{,}0$	$44{,}7 \pm 4{,}2$	$30{,}9 \pm 3{,}0$
Аспіринова модель	$20{,}6 \pm 2{,}0$	$18{,}9 \pm 1{,}5$	$43{,}4 \pm 4{,}2$	$39{,}3 \pm 3{,}5^*$
Етанолова модель	$23{,}3 \pm 2{,}0^*$	$16{,}5 \pm 1{,}5^*$	$34{,}3 \pm 3{,}2^*$	$47{,}6 \pm 4{,}5^*$
Стресова модель	$14{,}6 \pm 1{,}2^*$	$20{,}4 \pm 2{,}0$	$38{,}6 \pm 3{,}5$	$47{,}0 \pm 4{,}5^*$

$^*p < 0{,}05$ щодо контролю.

пов'язаним із залученням інших механізмів, які викликають гіперактивацію ЕРФ-рецепторних тирозинових кіназ за умов розвитку даної патології.

Збільшення активності тирозинових протеїнкіназ у рамках сигнальної трансдукції викликає дисбаланс системи контролю росту нормальних клітин, що спричиняє клітинну трансформацію [11].

Порушення функціональної активності рецепторних тирозинових протеїнкіназ дають підставу очікувати дисбаланс тригерних внутрішньоклітинних сигнальних послідовностей, які мають місце при трансдукції сигналу від ЕРФ та його рецепторів. ЕРФ регулює регенерацію епітеліоцитів слизової оболонки шлунка. Зміни секреції ЕФР призводять до порушення секреції HCl.

Таким чином, на підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що тирозинові протеїнкінази — чутливий ланцюг у каскадах трансдукції сигналу за умов виразки шлунка і є залученими до метаболічних шляхів, порушення у функціонуванні яких призводить до виникнення досліджуваного патологічного процесу.

1. *Гройсман С. Д., Каревина Т. Г.* О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс // Библиогр. указ. ВИНИТИ. Деп. рукопись. – 1979. – № 12. – С. 131.
2. *Справочник* практического врача по гастроэнтерологии // Под ред. В. Т. Ивашкина, С. И. Рапопорта. – Москва: Советский спорт, 1999. – 432 с.
3. *Доклінічні* дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації // За ред. О. В. Стефанова. – Київ: Авіцена, 2001. – 528 с.
4. *Kates M.* Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. – Amsterdam: Elsevier, 1986. – 464 p.
5. *Gill G. N., Walton G. M.* Assay of cyclic nucleotid dependent protein kinase // Raven Press. – 1997. – **10**. – P. 93–105.
6. *Остапченко Л. И., Протас А. Ф., Кучеренко Н. Е.* Выделение и некоторые свойства Ca^{2+}, фосфолипидзависимой протеинкиназы серого вещества головного мозга крыс на раннем этапе воздействия ионизирующей радиации // Радиобиология. – 1986. – **26**, № 6. – С. 761–765.
7. *Boutin J. C.* Tyrosine protein kinase assays // J. Chromatogr. – 1996. – **684**. – P. 179–199.
8. *Newton A. C.* Protein kinase C: structure, function, and regulation // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, No 48. – P. 28495–28498.
9. *Newton A. C., Keranen L. M.* Phosphatidyl-L-serine is necessary for protein kinase C's high-affinity interaction with diacyldlycerol-contaning membranes/ // Biochemistry. – 1994. – **33**. – P. 6651–6658.
10. *Bell R. M., Burns D. J.* Lipid activation of protein kinase C // J. Biol. Chem. – 1991. – **266**, No 8. – P. 4661–4664.
11. *Ullrich A., Schlessinger J.* Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity // Cell. – 1990. – **61**, No 4. – P. 203–212.

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 26.12.2005