

ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АЛЛОКСАНОВОМ И СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ

**И.М. Русина, А.Ф. Макарович, Е.А. Макар,
Т.А. Лучко, И.Э. Гуляй, В.Ф. Сивук**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
ГНУ «Институт биохимии НАН Б»
Г. Гродно, Беларусь

Проблемы лечения и коррекции сахарного диабета у сельскохозяйственных животных не сняты с повестки дня и в настоящее время. Особенно подвержены этому заболеванию лошади, свиньи и другие животные с однокамерным желудком. Биохимической основой для успешной разработки методов коррекции отклонений метаболизма является изучение свойств ферментов и механизмов их регуляции в тканях животных. В литературе имеются многочисленные сведения о сдвигах в энергетической обеспеченности клетки в условиях сахарного диабета [1, 2, 3, 4]. Было показано, что колебания уровней нуклеозид-5'-трифосфатов находятся в тесной зависимости от активности ферментов их биосинтеза [1, 5]. В настоящее время, однако, практически ничего не известно о ферментах катаболизма высокоэнергетических трифосфатов, которые также могут вносить определенный вклад в формирование энергетического статуса клетки при данной патологии. В связи с этим цель представленной работы заключалась в исследовании активности и свойств растворимой НТФазы печени крыс в норме и при хроническом аллоксановом и стрептозотоциновом диабете. Кроме того, нами исследовано распределение данного фермента в органах и тканях крысы и быка.

Эксперименты выполнялись на белых крысах-самцах линии Вистар массой 150-200 г, содержащихся на обычном рационе вивария со свободным доступом к воде. Сахарный диабет вызывали путем однократного внутрибрюшинного введения аллоксана в дозе $170 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ натошак, стрептозотоцина – $60 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$. Соответствующие навески препаратов растворяли в цитратном буфере, pH 4,5 непосредственно перед введением животному. Развитие сахарного диабета контролировали, определяя концентрацию глюкозы в крови глюкозооксидазным методом. Уровень глюкозы в крови опытных крыс составлял $12,4\text{-}32,0 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ при аллоксановом диабете и $8,16\text{-}31,1$ – при стрептозотоциновом.

Исследования экстрактов из печени крыс показали, что у животных аллоксановой группы НТФазная активность достоверно снижается с $3,74 \pm 0,2$ до $2,48 \pm 0,3$ Ед \cdot г⁻¹ сырой ткани (Рис. 1, $p < 0,01$), а в условиях стрептозотоцинового диабета – с $3,43 \pm 0,14$ до $2,85 \pm 0,21$ Ед \cdot г⁻¹ сырой ткани ($p = 0,0207$, $n = 6$). Таким образом, в обеих моделях воспроизводится однонаправленный эффект, однако количественные изменения при стрептозотоциновом диабете выражены в меньшей мере. С одной стороны, очевидно, это может объясняться более мягким действием стрептозотоцина на организм животных. В то же время, нельзя исключить, что наблюдаемые различия в степени снижения НТФазной активности связаны со сроками проведения моделей.

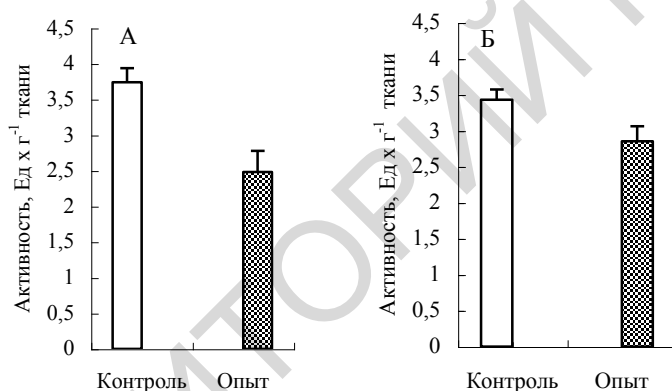


Рис. 1. Активность растворимой НТФазы в экстрактах из печени контрольных животных и крыс с аллоксановым (А) и стрептозотоциновым (Б) диабетом

Изменения активности ферментов при патологических состояниях организма могут быть обусловлены причинами различного характера. Если речь не идет об энзимопатиях наследственной природы (нарушение структуры вследствие мутаций), основные механизмы, определяющие развитие данного феномена, включают в себя изменение количества фермента (индукция или репрессия синтеза, усиление распада) и модуляцию каталитической активности, что может осуществляться на уровне микроокружения (обратимое ингибирование или активация) либо ковалентной модификации. Для выяснения причин, лежащих в основе снижения активности НТФазы в печени диабетных крыс, мы провели исследование кинетических свойств фермента, частично очищенного на калиброванной белками-стандартами колонке с сефакри-

лом S-200. Молекулярная масса НТФазы по данным геле-хроматографии равна $63,7 \pm 0,9$ кДа.

Результаты кинетических исследований показали, что фермент проявляет рН-оптимум при рН 7,0 и обладает широкой субстратной специфичностью, осуществляя гидролиз ИТФ, УТФ, ЦТФ, ГТФ, ИДФ, ХТФ и с меньшей скоростью – дТТФ и АТФ (данные не представлены).

Очищенный фермент подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен в диапазоне концентраций ИТФ 25-250 мкМ. Значения кажущейся K_m НТФазы из печени крыс при аллоксановом диабете и контрольных животных составляли соответственно $54,3 \pm 1,6$ и $32,3 \pm 1,3$ мкМ ($n = 6$, $p < 0,01$). Таким образом, кинетический анализ указывает на то, что изменение каталитических свойств фермента у аллоксановых крыс связано с его ковалентной модификацией. Однако K_m НТФазы печени в условиях стрептозотоцинового диабета практически не изменялась ($35,8 \pm 3,3$ мкМ). И это означает, что снижение НТФазной активности экстрактов может быть связано либо с репрессией синтеза фермента либо с модификацией, влияющей на каталитическую константу.

На данном этапе нельзя ничего сказать о действии диабета на экспрессию НТФазы, так как мы имеем дело с неизвестным ранее белком, отличающимся своими свойствами от уже описанных растворимых НТФаз [6, 7]. В настоящее время нет никаких сведений об очистке или первичной структуре этого фермента, в связи с чем пока не представляется возможным провести исследование его экспрессии на уровне белка или мРНК.

Литературные данные свидетельствуют о том, что развитие аллоксанового диабета сопровождается снижением содержания нуклеозид-5'-трифосфатов в печени крысы. По данным Weber et al. [3], например, концентрации АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ у опытных животных падали соответственно до 66, 62, 54 и 63% по сравнению с контрольной группой. Аналогичная ситуация имеет место и в некоторых других органах и тканях – хрусталике глаза, сердечной и скелетной мышцах [5], при этом изменения уровней нуклеозид-5'-трифосфатов сопряжены с пониженной активностью ферментов их биосинтеза – оротатфосфорибозил-трансферазы, уридинфосфорилазы, уридин-цитидин-киназы, урацилфосфорибозил-трансферазы, ЦТФ-синтазы, ИМФ-дегидрогеназы и др. [3]. Тот факт, что в печени диабетных крыс снижается активность растворимой НТФазы, дает нам основание полагать, что данный фермент принимает участие в регуляции уровня нуклеозид-5'-трифосфатов, внося тем самым вклад в формирование энергетического статуса клетки в соответствии с конкретными физиологи-

ческими условиями. Эта функция, по-видимому, осуществляется не только в гепатоцитах но и клетках других типов, т. к. полученные с помощью гель-фильтрации результаты свидетельствуют о широком распространении низкомолекулярной растворимой НТФазы в органах и тканях крысы и быка – НТФазные пики, соответствующие белку с молекулярной массой около 60 кДа обнаружены при хроматографии экстрактов из головного мозга, сердца, почек, селезенки, тонкого кишечника, легких и скелетных мышц.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что изучены далеко не все возможные компенсаторные механизмы, направленные на поддержание энергетического баланса в клетках печени при сахарном диабете. Точно так же остается неясной биологическая роль ряда растворимых НТФаз [6, 7], которые могут участвовать в адаптационных механизмах, связанных с гомеостазом нуклеозид-5'-трифосфатов.

Литература

1. Relationship between renal function and metabolic alterations in early streptozocin-induced diabetes in rats. P. Cortes, F. Dumler, J. Goldman, N.W. Levin // *Diabetes*. – 1987. – Vol. 36. – P. 80–87.
2. The purified yeast pre-mRNA splicing factor PRP2 is an RNA-dependent NTPase. S.H. Kim, J. Smith, A. Claude, R.J. Lin // *EMBO J.* – 1992. – Vol. 11: – P. 2319–2326.
3. Regulation of purine and pyrimidine metabolism by insulin and by resistance to tiazofurin. G. Weber, M.S. Lui, H.N. Jayaram e.a. // *Adv. Enzyme Regul.* – 1985. – Vol. 23. – P. 81–99.
4. Williams M, Jarvis M.F. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 15. – P. 1173–1185.
5. Changes in uridines and uridine nucleotide sugars in diabetic rat lens: implications in membrane glycoprotein formation. J.S. Hothersall, R.P. Muirhead, C.E. Tylaur e.a. // *Biochem. Med. Metab. Biol.* – 1993. – Vol. 50. – P. 292–300.
6. Нарыжный С.Н., Крутяков В.М. Неспецифическая кислая нуклеозидтрифосфатаза цитозоля и хроматина печени крысы: частичная очистка и основные свойства // *Биохимия*. – 1982. – Т. 47. – С. 569–574.
7. Dahlmann N., Kirchgesser M. Acid nucleoside triphosphatase: partial purification and characterization of a new enzyme from human serum // *Biochem. Int.* – 1990. – Vol. 20. – P. 317–327.

Резюме

Ключевые слова: нуклеозид-5'-трифосфатаза, диабет, печень, органы и ткани, крыса, бык.

В работе впервые исследованы активность и кинетические свойства растворимой НТФазы печени крыс в норме и при экспериментальном диабете. Показано, что НТФазная активность в печени животных с аллоксановым диабетом ниже по сравнению с контролем на 34% ($p < 0,01$), при этом кажущаяся K_m фермента возрастает с $32,3 \pm 1,3$ до

54,3 ± 1,6 мкМ. При стрептозотоциновом диабете активность фермента снижалась на 24% ($p < 0,021$) без изменений величины K_m (35,8 ± 3,3 мкМ). Частично очищенная НТФаза проявляет рН-оптимум при рН 7,0 и обладает широкой субстратной специфичностью, осуществляя гидролиз ИТФ, УТФ, ЦТФ, ГТФ, ИДФ, ХТФ и с меньшей скоростью – дТТФ и АТФ. Фермент широко распространен в различных органах и тканях крысы и быка

Summary

Key words: nucleoside-5'-triphosphatase, diabetes, liver, tissue distribution, rat, cattle.

Activity and kinetic properties of soluble NTPase have been studied in the liver of normal and diabetic rats. It has been shown that NTPase activity in the liver of alloxan treated animals decreases by 34% ($p < 0.01$) as compared to the control ones; the apparent K_m of the enzyme increasing from 32,3 ± 1,3 to 54,3 ± 1,6 microM. In streptozocin-induced diabetes the enzyme activity was reduced by 24% ($p < 0.021$) without any changes in K_m value. Partially purified NTPase displayed a pH optimum of 7.0 and possesses a wide substrate specificity, being capable of hydrolysing ITP, UTP, CTP, GTP, IDP, XTP as well as with low efficiency dTTP and ATP. The enzyme occurs in various rat and bovine tissues.

УДК 619:616-07:636.5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИТИЯ КАРБОНАТА В ПТИЦЕВОДСТВЕ

Ю.Н. Бобёр, О.М. Каморник

УО "Гродненский государственный аграрный университет"
г. Гродно, Республика Беларусь

Исследования по влиянию солей лития на организм птиц ведутся достаточно давно. При оценке воздействия карбоната лития на организм кур установлено, что полулетальная доза (LD_{50}) для цыплят месячного возраста составляет 292,1 – 447,9 мг/кг массы тела. Неудовлетворительная переносимость (жажда, понос) проявляется при ежедневном, в течение 15 дней, назначении его с кормом начиная с дозы от 20 до 50 мг/кг массы тела. Лития карбонат, назначаемый цыплятам с кормом ежедневно в течение месяца в дозах от 0,1 до 10 мг/кг массы тела, не оказывал токсического действия на цыплят.

В 1989 году Главным управлением ветеринарии СССР было утверждено временное наставление по применению препарата лития карбоната при токсической дистрофии птиц. Для профилактики данного