

Vpliv različnih koncentracij etanola na tvorbo fosfatidiletanola in fosfatidne kisline v humanih neuroblastomskih SH-SY5Y celicah*

Effect of different ethanol concentrations on phosphatidylethanol and phosphatidic acid formation in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells

Martina Jarc**

Deskriptorji
alkohol, etilni
fosfatidne kisline-biosinteza
neuroblastom
kulture tumorskih celic

Descriptors
alcohol, ethyl
phosphatidic acids-biosynthesis
neuroblastoma
tumor cells, cultured

Izvleček. Ugotavljali smo škodljiv vpliv alkohola na prenos informacij v humanih neuroblastomskih celicah SH-SY5Y. Pod vplivom alkohola se zaradi njegove topnosti v maščobah spremeni fizikalna in kemična struktura membran. V prisotnosti encima fosfolipaze D nastaja specifični produkt fosfatidiletanol, ki se sintetizira tako, da onemogoča tvorbo fosfatidne kisline. Z naraščajočo koncentracijo etanola (25 mmol/l, 50 mmol/l, 100 mmol/l, 150 mmol/l) narašča koncentracija fosfatidiletanola in pada koncentracija fosfatidne kisline. Tvorba fosfatidiletanola poteka v celoti na račun preprečevanja tvorbe fosfatidne kisline. Alternativne poti tvorbe le-te v humanih neuroblastomskih celicah SH-SY5Y ni. Pri 150 mmol/l etanola je tvorba fosfatidne kisline v celoti zavrta.

Abstract. The effect of ethanol on the process of signal transduction was studied in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells. By dissolving in the cell membrane ethanol changes its chemical and physical structure. In the presence of membrane enzyme phospholipase D, a specific product phosphatidylethanol is formed, at the expense of normal formation of phosphatidic acid. Higher ethanol concentrations (25 mmol/l, 50 mmol/l, 100 mmol/l, 150 mmol/l) increasingly inhibit phosphatidic acid formation and stimulate phosphatidylethanol synthesis. Phosphatidylethanol is formed exclusively at the expense of phosphatidic acid and no other mechanism of phosphatidic acid synthesis is present. The formation of phosphatidic acid is completely inhibited by adding 150 mmol/l ethanol.

Uvod

Pretirano uživanje alkohola predstavlja enega glavnih zdravstvenih in socialnih problemov povsod po svetu. Alkohol je za kofeinom druga najbolj uporabljena psihoaktivna substanca na svetu. Čeprav je učinek alkohola podobno nevaren kot učinki številnih drugih drog, je alkohol tako globoko vkoreninjen v naši kulturi, da se ne zavedamo njegove nevarnosti. Veliko je bilo napisanega o vplivu alkohola na zdravje in o njegovem socialnem vplivu, manj pa je razjasnjen sam mehanizem njegovega delovanja.

Za razliko od številnih drugih drog, ki vplivajo na centralni živčni sistem (npr. opiat in benzodiazepini), etanol ne deluje na specifične receptorje v centralnem živčevju. Splošno sprejeto mnenje je, da poleg vpliva na niz različnih nevrotransmiterjev (GABA, glutamat, serotonin), etanol vpliva tudi na kemično in fizikalno zgradbo celične membra-

* Naloga je bila opravljena kot raziskovalna naloga programa TEMPUS leta 1994.

** Martina Jarc, štud. med., Inštitut za psihiatrijo in nevrokemijo, Univerza mesta Lund, Švedska.

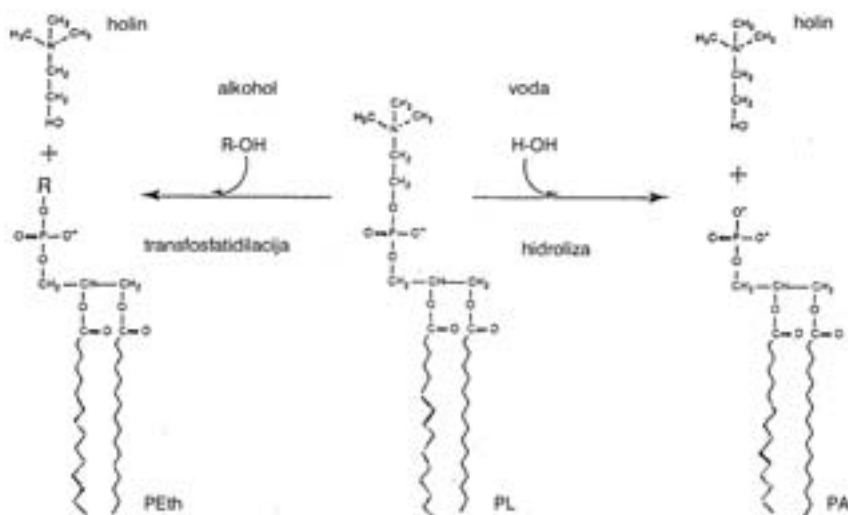
ne. Ker je topen v celičnih membranah, rahlja vezi med lipidi, to pa vodi do utekočinjenja membran in s tem do njihovega spremenjenega delovanja. Fosfolipidi celičnih membran so pomembni pri delovanju Na^+K^+ -ATPaze, proteinske kinaze C in kot receptorji za nevrottransmiterje. Alkohol tako spremeni sposobnost živčne celice za obdelavo podatkov.

V zadnjih nekaj letih je bilo dokazano, da je eden pomembnejših membranskih encimov, ki sodelujejo pri prenosu podatkov v celični membrani fosfolipaza D (PLD) (1, 2). Encim katalizira hidrolizo fosfolipidov in tvorbo fosfatidne kisline (PA) (3). V prisotnosti alkohola reakcijo hidrolize fosfolipidov zamenja reakcija transfosfatidilacije, ki vodi do vgrajevanja kratkoverižnih alkoholov (etanol, metanol in 1-butanol) v fosfolipide (1, 2, 4, 5). V prisotnosti etanola je produkt te reakcije s fosfolipazo D fosfatidiletanol (PEth) (6).

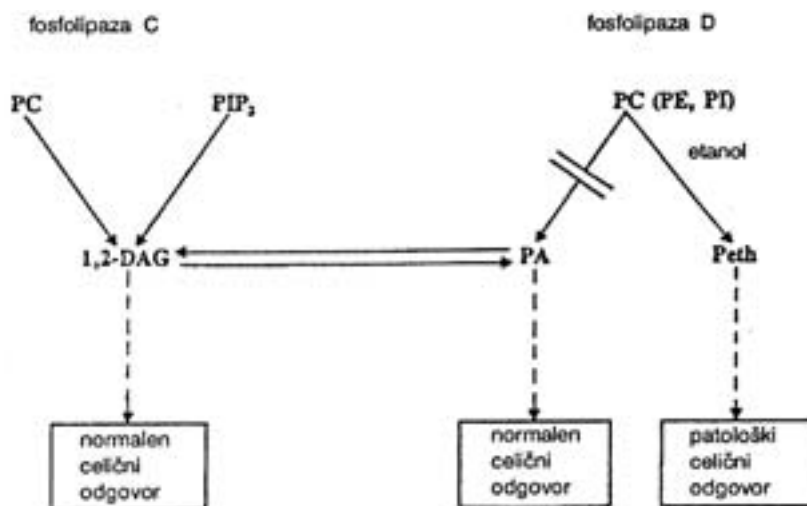
PEth je edinstven fosfolipid, ki nastaja v celični membrani samo v prisotnosti etanola in PLD (7, 8). Lahko ga uporabimo kot označevalec za merjenje aktivnosti encima. Še več, tvorba PEth, ki nastane na račun PA, predstavlja mehanizem, s katerim etanol specifično vpliva na obdelavo podatkov (9).

PLD lahko aktiviramo prek različnih receptorjev (muskarinsko acetilholinskih, P2-purinergičnih receptorjev in $\alpha 1$ adrenergičnih receptorjev). Druga pomembna pot aktivacije encima je stimulacija proteinske kinaze C z 12-O-tetradekanoil 13-forbol acetatom (TPA) (9, 10).

Pri obdelavi podatkov obstaja tesna zveza med fosfolipazo C (PLC) in fosfolipazo D (9, 11). Etanol zavira normalno tvorbo PA s PLD. Obstaja pa še ena pot tvorbe fosfatidne kisl-



Slika 1. Pod vplivom etanola v prisotnosti fosfolipaze D (PLD) namesto fosfatidne kisline (PA) nastane fosfatidiletanol (PEth).



Slika 2. Tvorba fosfatidne kisline (PA) poteka z encimoma fosfolipazo D in fosfolipazo C. PC – fosfatidilholin, PIP₂ – fosfatidil inozitol bifosfat, 1,2-DAG – 1,2-diacilglicerol, PE – fosfatidiletanolamin, PI – fosfatidil inozitol.

ne prek vmesnega produkta diacilglicerola (DAG) z encimom PLC. Učinek etanola je tako odvisen od relativne koncentracije sekundarnih prenašalcev, ki nastanejo iz lipidov pod vplivom PLC in PLD (9).

Namen raziskave

Namen raziskovalne naloge je bil proučevanje vpliva različnih koncentracij etanola na tvorbo PE_{th} in ugotavljanje zmanjšanja tvorbe fosfatidne kisline PA. Preizkuse smo izvajali na humanih nevroblastomskih celicah SH-SY5Y. Za stimulacijo fosfolipaze D smo uporabili TPA.

Materiali in metode

Materiali

SH-SY5Y celice so bile darilo dr. S. Pahlsona s Patološkega inštituta Univerze v Uppsali na Švedskem. Posodice za tkivne kulture so bile od podjetja Costar (ZDA). Medij za celične kulture (Eaglesov osnovni medij z L-glutaminom in Earlsovo soljo) s 4-(2-hidroksietil)1-piperazinetansulfonsko kislino (HEPES) in brez nje in fetalni telečji serum so bili od podjetja GIBCO (Škotska). Streptomycin in penicilin smo dobili pri ASTRA Pharmaceuticals (Švedska). ³H-palmitinska kislina s specifično radioaktivnostjo 60,0 Ci/mmol je bila od podjetja Dupont NEN Product (ZDA). HPTLC-plošče (silica gel 60) so bile od

podjetja Merck (Nemčija). PEth standard smo sintetizirali v skladu z metodo Eibl in Kovatchev (1981) iz fosfatidilholina jajčnega rumenjaka s pomočjo fosfolipaze D iz orešk (Sigma chemical co., ZDA). Eco-scint-A tekočina je bila od podjetja National Diagnostics (ZDA). Ostale kemikalije so bile od podjetja Sigma chemical co.

Celične kulture

Humane nevroblastomske celice SH-SY5Y smo kultivirali v plastične posodice premera 60 mm, ki so vsebovale Eaglesov osnovni medij z L-glutaminom in Earlsovo soljo, z dodatkom 10 % fetalnega telečjega seruma, 10 IU/ml penicilina in 10 µg/ml streptomicina. Celice smo po presaditvi v posodice pustili rasti en teden v inkubatorju z navlaženim ozračjem, ki je vsebovalo 5 % CO₂ in 95 % zraka. Enkrat v teku tedna smo zamenjali medij. Uporabili smo celice iz presaditev 45–60.

Inkubacija celic

Celice smo označili s ³H-palmitinsko kislino (4 µCi/ml medija) za šest ur. Označevanje je potekalo v odsotnosti seruma in antibiotikov v mediju. Petnajst minut preden smo dodali etanol in TPA, smo zamenjali medij z drugim, namenjenim celičnim kulturam, ki mu je bil dodan HEPES s pH 7,4. Najprej smo dodali etanol v različnih koncentracijah, pet minut nato pa TPA. Po petnajstih minutah smo reakcijo zaustavili z dodatkom 500 µl ledeno mrzlega izopropanola. Posodice smo sprali z vodo in postrgali celice v epruvete s kloroformom in metanolom v razmerju 1:2 in s standardi PA, PEth in monogliceridov v ustrezni prostornini.

Ekstrakcija lipidov in njihova separacija

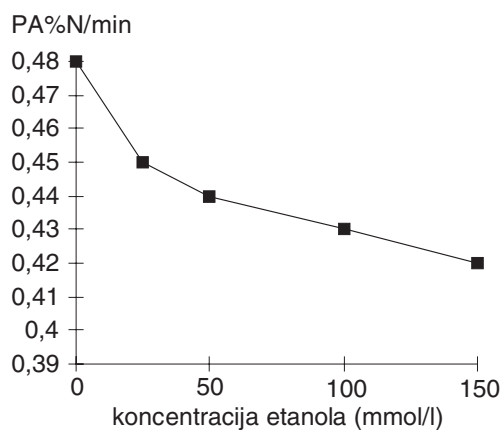
Lipide smo ekstrahirali po metodi Bligh and Dyer (1959) z ekstrakcijo s kloroformom. Topilo smo uparili s pomočjo dušika, lipide pa smo ponovno raztopili v kloroformu in metanolu v razmerju 2:1. Nato smo jih nanесли na HPTLC plošče. Kot topilo za izolacijo PEth in PA smo uporabili zmes etil-acetata, izo-oktana in očetne kisline v volumskem razmerju 90:50:20. Plošče smo obarvali z jodom. Mesta, ki so odgovarjala posameznim fosfolipidom, smo postrgali v scintilacijske valjčke in izmerili radioaktivnost v scintilacijskem števcu. V scintilacijskem števcu smo izmerili število sunkov vseh jedrskih razpadov radioaktivnih elementov v eni minuti in določili relativni delež razpadov označenih snovi (³H-fosfatidne kisline, ³H-fosfatidiletanola).

Prikaz podatkov

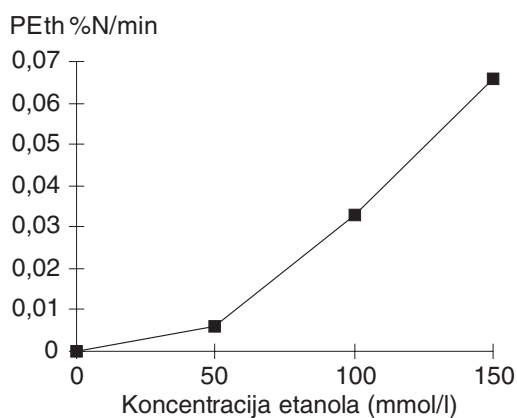
Podatki so prikazani kot povprečne vrednosti. Statistične razlike smo ovrednotili z uporabo Studentovega t-testa.

Rezultati

Prikazani so rezultati sinteze fosfatidne kisline (PA) in fosfatidiletanola (PEth) v odvisnosti od različnih koncentracij etanola.



Slika 3. Spremembe v tvorbi fosfatidne kisline (PA) po stimulaciji z 12-O-tetradekanoil 13-forbolacetatom (TPA) v mediju z različnimi koncentracijami alkohola (N ustreza številu sunkov razpada vseh fosfolipidov).



Slika 4. Spremembe v tvorbi fosfatidiletanola (PEth) po stimulaciji z 12-O-tetradekanoil 13-forbolacetatom (TPA), v mediju z različnimi koncentracijami etanola.

Z naraščajočo koncentracijo etanola je bila tvorba fosfatidne kisline vedno bolj onemogočena. Pri najvišji koncentraciji etanola (150 mmol/l) je bila tvorba fosfatidne kisline najbolj zavrta.

Z naraščajočo koncentracijo etanola je naraščala koncentracija PEth. Pri etanolni koncentraciji 150 mmol/l je bila njegova tvorba največja.

Razpravljanje

V raziskovalni nalogi smo dokazali, da sta v humani nevroblastomski celični kulturi SH-SY5Y inhibicija tvorbe PA in stimulacija tvorbe PEth odvisni od koncentracije etanola.

Višje etanolne koncentracije v mediju bolj preprečujejo tvorbo PA in bolj spodbujajo tvorbo PEth.

Pri koncentraciji etanola 150 mmol/l smo dobili enako količino PEth (0,06 %N/min vseh fosfolipidov), kot je bila inhibicija tvorbe PA (0,06 %N/min vseh fosfolipidov). Iz tega lahko sklepamo, da se PEth tvori na račun PA in da ni druge poti tvorbe PA. Koncentracija PA pred dodatkom TPA je bila enaka kot po dodatku 150 mmol/l etanola (0,425 %N/min vseh fosfolipidov). S tem smo dokazali, da je bila tvorba PA v celoti zaustavljena po dodatku 150 mmol/l etanola.

V raziskavi smo dobili majhne poraste sinteze PEth ob dodatku etanola. Možni odstopi za statistična odstopanja pri majhnih koncentracijah PEth so:

- na HPTLC ploščah ni bilo velike razlike med položajem monogliceridov in PEth in pri postrganju plošč je bilo težko določiti točno mejo med njimi;
- monogliceridi so bolj radioaktivni in zato dajejo veliko število radioaktivnih sunkov na minuto, medtem ko je PEth precej manj radioaktiven. Že majhna količina monogliceridov, pomešana med PEth, nam je povzročala odstopanja pri merjenju radioaktivnosti v scintilacijskem števcu;
- radioaktivno je bilo ozadje samih plošč.

Morda bi bilo bolje, če bi uporabili ^3H -glicerol namesto ^3H -palmitinske kisline za označevanje fosfolipidov v celičnih kulturah. A celice SH-SY5Y ne vgrajujejo ^3H -glicerola v svoje fosfolipide.

Kaj nam vsi ti rezultati pomenijo v vsakdanjem življenju? Pri npr. 2,3% alkohola v krvi (50 mmol/l etanola) bi prišlo do delne zavore sinteze fosfatidne kisline in do toksičnih učinkov fosfatidiletanola na živčne celice. Do popolne zavore tvorbe fosfatidne kisline pa bi prišlo pri 7% alkohola v krvi (150 mmol/l etanola), kar pa ni več združljivo z življenjem.

Zahvale

Raziskovalno nalogo mi je omogočil sklad za štipendiranje programa TEMPUS iz Bruslja. Nalogo sem opravljala na Inštitutu za psihiatrijo in nevrokemijo na Univerzi mesta Lund na Švedskem. Zahvaljujem se mentorici Leni Gustavsson in prof. Christerju Allingu za njuno pomoč in spodbude pri delu. Pri izvajanju laboratorijskih preiskav mi je bila v veliko pomoč Berit Farjh.

Pri prevodu raziskovalne naloge v slovenščino sta mi s koristnimi nasveti pomagala prof. Katja Breskvar in prof. David Vodušek.

Literatura

1. Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 958–63.
2. Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem* 1987; 48: 1597–603.

3. Kanfer JN. The base-exchange enzymes and phospholipase D of mammalian tissues. *Can J Biochem* 1980; 58: 1370.
4. Dawson RM. The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D. *Biochem J* 1967; 102: 205.
5. Yang SF, Freer S, Benson AA. Transphosphatidylation by phospholipase D. *J Biol Chem* 1967; 242: 477.
6. Alling C, Gustavsson L, Benthin G, Anggard E. Phosphatidylethanol formation in rat organs after ethanol treatment. *Biochim Biophys Acta* 1984; 793: 119–22.
7. Metz SA, Dunlop M. Production of phosphatidylethanol by phospholipase D phosphatidyltransferase in intact or dispersed pancreatic islets: Evidence for the in situ metabolism of phosphatidylethanol. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283: 417.
8. Gustavsson L, Moehren G, Hoek B. Phosphatidylethanol formation in rat hepatocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 625: 438.
9. Gustavsson L, Lundquist C, Hanson E, Rodriquez D, Simonsson P, Alling C. *Alcohol, Cell membranes, and Signal transduction in Brain*. New York: Plenum Pub, 1993: 63–73.
10. Gustavsson L, Hansson E. Stimulation of phospholipase D activity by phorbol esters in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1990; 54: 737–42.
11. Shukla SD, Halenda SP. Phospholipase D in cell signalling and its relationship to phospholipase C. *Life Sci* 1991; 48: 851–66.

Prispelo 3.4.1995