

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І
РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО

На правах рукопису

НАЛЬБОВІНА ОКСАНА ЄВГЕНІЇВНА

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ВМІСТ
ЦИКЛІЧНИХ НУКЛЕОТИДІВ І АКТИВНІСТЬ ЦАМФ-ЗАЛЕЖНИХ
ПРОТЕЇНАЗ В ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИНАХ ЩУРІВ

03.00.08.- радіобіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1995

АВ 33.647

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії біологічного факультету Київського університету ім.Тараса Шевченка.

Науковий керівник - чл.-кор.НАН України, доктор біологічних наук, професор **М.Є. Кучеренко**;

Офіційні опоненти :

доктор медичних наук, професор **В.А. Барабой**

доктор медичних наук, професор **В.О. Шляховенко**

Провідна установа - Київський державний медичний університет ім. О.О.Богомольця

Захист відбудеться "___"_____ 1995 р о ___ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.83.01. в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (252022, м.Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці ІЕПОР НАН України.

Автореферат роісланий "___"_____ 1995 р.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук

Г.Й. Лавренчук

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00754987 (/)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Важливим фактором, який визначає закономірності радіаційного ураження організму, є радіочутливість тканин, органів і систем, які відповідають за виживання організму (Ярмоненко, 1981, Кудряшов і Беренфельд, 1982). Морфологічні дослідження показали, що найбільш радіочутливими є кровотвірні та лімфоїдні органи. Ураження кісткового мозку, тимусу, селезінки та лімфатичних вузлів становить один з найважливіших проявів гострого променевого захворювання (Белоусова, 1979, Жербин, 1989).

Причинами імунodefіциту, який розвивається після опромінення, є інтерфаза загибель, пошкодження функції та міграційних властивостей лімфоцитів (Ярилин, 1988, Anderson, 1976). Постпроменева патологія поверхні лімфоцитів, пов'язана з втратою мембранних рецепторів, може бути одним з важливих факторів наступного зниження функціональної активності та деградації цих клітин. Тест на здатність лімфоцитів вступати до бласттрансформації під впливом поліклональних мітогенів це - інтегральний показник, який характеризує функціональний стан імунної системи при різних патологіях, таких як первинні і вторинні імунodefіцитні стани, аутоагресивні захворювання та пухлинний ріст (Хоробрых, 1982). Зміна ДНК-синтезуючої здатності лімфоцитів при опроміненні може бути визвана дефектністю самих клітин або змінами співвідношень різних субпопуляцій лімфоцитів.

Крім пригнічуючої дії опромінення на лімфоцити описані протилежні реакції клітин - активація, диференціація, підсилення секреції гуморальних факторів (Шарый, 1986, Норре, 1989). Ця різновидність ефектів обумовлена особливостями молекулярних процесів, які індукуються опроміненням в лімфоцитах. На теперішній час до кінця не досліджене питання про природу фізико-хімічних проце-

сів, які приводять до біохімічних та морфологічних змін лімфоїдних клітин і, в решті-решт, до їх загибелі, а також до зміни їх функціональної активності або пострадіаційного відновлення. В зв'язку з тим значний інтерес являє цАМФ-залежне фосфорилування, яке займає провідне положення в регуляції багатьох внутрішньоклітинних процесів, каталізуючи реакції фосфорилування різних білкових субстратів (Новикова, 1995, Farrar, 1985). Біологічна роль цАМФ-залежних протеїнкіназ полягає в регуляції внутрішньоклітинних процесів та специфічному контролі за дією найважливіших ферментативних систем (Dei et al., 1988). Вивчення зникнення та розвитку різних порушень на молекулярному рівні, з'ясування механізмів змін протеїнкіназної активності при радіаційних впливах на організм - актуальні та важливі завдання сучасної радіобіології.

В доступній нам літературі є тільки поодинокі роботи про вплив радіації на активність цАМФ-залежних протеїнкіназ та їх регуляцію. Вивчення молекулярних механізмів функціонування А-кінази лімфоцитів в умовах променевого ураження може відіграти важливу роль у визначенні причин, які приводять до зміни функціональної активності або загибелі клітини.

Мета і задачі дослідження. Метою даного дослідження було вивчення впливу рентгенівського випромінювання в дозах 0,5 і 1 Гр на функціонування системи цАМФ-залежного фосфорилування білків лімфоїдних клітин щурів. Для досягнення поставленої мети до завдань роботи входило :

1. Вивчити функціональну активність лімфоїдних клітин тимусу і селезінки щурів після опромінення .
2. Оцінити вплив рентгенівського опромінення на функціонування аденілатциклазної системи в лімфоцитах.
3. Виділити цАМФ-залежну протеїнкіназу з лімфоцитів конт-

рольних та опромінених шурів, вивчити деякі її фізико-хімічні та каталітичні властивості.

4. Визначити кінетичні характеристики ферменту в контролі та після опромінення.

5. Дослідити особливості регуляції активності цАМФ-залежної протеїнкінази, виділеної з лімфоцитів контрольних та опромінених тварин.

Наукова новизна і практична значимість роботи. Встановлені пострадіаційні порушення функціональної активності лімфоїдних клітин тимусу та селезінки шурів після впливу рентгенівськими променями в дозах 0,5 і 1 Гр. Вперше проведено в цих умовах комплексне дослідження функціонування аденілатциклазної системи та системи цАМФ-залежного фосфорилування в лімфоїдних клітинах. Досліджено вплив радіації на фізико-хімічні властивості та регуляцію активності цАМФ-залежної протеїнкінази, виділеної з лімфоцитів селезінки шурів через 12 годин після опромінення. Показано, що основний внесок в виявлені після опромінення порушення в функціонуванні цАМФ-залежного фосфорилування в лімфоцитах шурів припадає на порушення взаємодії ферменту з білковим субстратом фосфорилування та основним активатором фосфотрансферазної реакції - циклічним аденозинмонофосфатом.

Одержані в роботі результати сприяють більш повному розумінню біохімічних механізмів розвитку променевого враження організму. На основі встановлених молекулярно-клітинних механізмів порушення функціонування системи цАМФ-залежного фосфорилування білків можна здійснювати розробку заходів по цілеспрямованому впливу на ці зміни з метою їх корекції. Результати досліджень можуть бути покладені в основу при розробці науково-обґрунтованих шляхів створення ефективних сполук, здатних модифікувати дію іонізуючої

радіації.

Положення, які виносяться на захист. 1. Під впливом опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр розвивається пригнічення розеткоутворюючої здатності і зростання бласттрансформації, які характеризують суттєві зміни функціональної активності лімфоцитів тимусу та селезінки щурів 2. Пострадіаційна дисфункція аденілатциклавної системи супроводжується залежним від дози радіації пригніченням активності цАМФ-залежної протеїнкінази, зниженням її спорідненості до гістону H₁ 2B та збільшенням спорідненості до цАМФ, яке під впливом автофосфорилування холоферменту змінюється зниженням його зв'язування з цАМФ.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи були представлені і повідомлені на Радіобіологічному з'їзді (Київ, 1993), на міжнародній конференції "Навколишнє середовище і здоров'я" (Чернівці, 1993), на науковій конференції професорсько-викладацького складу Київського університету ім.Тараса Шевченка (Київ, 1993), на 1 з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), на засіданні кафедри біохімії Київського університету.

Впровадження. Матеріали дисертаційної роботи використовуються в курсах лекцій "Радіаційна біохімія" Київського університету ім.Тараса Шевченка.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 7 робіт.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів роботи та їх обговорення, заключення, висновків,

списку літератури, що складається з 285 робіт. Дисертація викладена на 170 стор., має у своєму складі 26 рисунків та 9 таблиць.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В дослідженнях використовували білих щурів-самців вагою 130-150 г. Тварин опромінювали на установці РУМ-17 в дозах 0,5 і 1 Гр за умов : потужність дози в повітрі 24,5 сГр/хв, фільтри 0,5 мм (Cu + Al), напруга 200 кВ, сила струму 5 мА, відстань до поверхні шкіри тварин - 50 см.

Тимус і селезінку перетирали через 4 шари нейлонової сітки у середовище 199. Фракцію лімфоцитів селезінки отримували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficoll-Raque (густина 1,077) за методом (Boyum, 1968).

Стан системи кровотворення оцінювали за такими морфологічними показниками : кількість лейкоцитів в 1 л крові і співвідношення різних форм лейкоцитів, які визначали в пофарбованих мазках крові.

Функціональну активність лімфоцитів оцінювали в реакціях Е-розеткоутворення за методом (Jondal, 1972), спонтанної клітинної цитотоксичності за методом (Гордиенко, 1984) і бласттрансформації за методом (Клох, 1982). Клітини (2×10^6 кл/мл) інкубували в мітогенами : конканавалін А "Sigma" (Кон А) у концентрації 10 мкг/мл, фітогемаглютинін "Sigma" (ФГА) - 12,5 мкг/мл, ліпополісахарид "Sigma" (ЛПС) - 50 мкг/мл.

Визначення вмісту циклічних нуклеотидів в лімфоїдних клітинах проводили за методом (Steiner, 1972). Активність фосфодіестерази циклічних нуклеотидів визначали за методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol (Лазаревич, 1979). Активність гуанілатциклази визначали за методом послідовної хроматографії на

колонках Al_2O_3 і Dawex (Nakasava, 1976). Активність аденілатциклази визначали за методом (White, Zenzer, 1974).

Виділення препаратів цАМФ-залежних протеїнкіназ з лімфоцитів селезінки щурів проводили по модифікованому методу (Greengard, 1979) з використанням лінійного градієнта концентрації калій-фосфатного буфера при елюції ферменту з ДЕАЕ-целюлози.

Визначення активності цАМФ-залежних протеїнкіназ з лімфоїдних клітин селезінки щурів проводили за методом (Gill, Walton, 1979). Про активність ферментів судили по включенню ^{32}P в $(\gamma\text{-}^{32}P)\text{-ATP}$ в гістон Н 2В. Інкубаційне середовище; ля визначення протеїнкінаазної активності в загальному об'ємі 0,1 мл містило: 25 мМ трис- HCl , рН 7,4; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДТТ; 10 мкг/мл гістона Н2В; 0,3 мкг/мл білка; 5×10^{-5} М $(\gamma\text{-}^{32}P)\text{-ATP}$ ($8\text{-}10 \times 10^4$ Бк) в пробу. Час інкубації 5 хв при $37^\circ C$. Реакцію зупиняли при $4^\circ C$ з наступним нанесенням проб на диски з фільтрувальної паперу "Фільтрак FN-23", які промивали за методом (Гривенников, 1979). Радіоактивність вимірювали в толуольному сцинтиляторі ЖС-103 на рідинно-сцинтиляційному лічильнику "Delta-300". Питому активність ферментів виражали в пмоль ^{32}P за 1 хв на 1 мкг білку.

Вивчення зв'язування $^3H\text{-cAMP}$ з цАМФ-залежними протеїнкіназами проводили за методом (Ульмасов, 1980). Інкубаційне середовище в загальному об'ємі 0,1 мл містило: 30 мМ калій-фосфатний буфер; 10 мМ $MgCl_2$; 2×10^{-6} М цАМФ ($7\text{-}10 \times 10^2$ Бк); альбумін 10 мкг/мл; 0,5-1,0 мкг/мл ферменту. Час інкубації 5 хв при $30^\circ C$. Реакцію зупиняли нанесенням суміші на ультрафільтри з діаметром пор 0,23 мкм з подальшим фільтруванням. Фільтри промивали 3 рази буфером, що містив: 30 мМ калій-фосфатний буфер; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДТТ; рН 6,8.

В експериментах по автофосфорилуванню використовували мето-

дичні рекомендації (Ульмасов, 1980). Дослідження здібності холо-ферменту до автофосфорилування проводили в інкубаційному середовищі загальним об'ємом 0,1 мл слідуєчого складу : 0,1 М Трис-НCl, рН 8,7; 10 мМ MgCl₂; 2 мМ ДТТ; 80 мМ NaCl; ферменту 0,05 мг/мл; 8 мкМ АТФ; (γ -³²P)-АТФ (9×10^3 Бк) і, де вказані відповідні концентрації цАМФ. Інкубацію проводили протягом 30 хв при 30° С. Реакцію зупиняли при 4° С.

Визначення білка в препаратах різної природи проводили за методом (Lowry, 1951).

Кінетичну обробку результатів проводили за модифікованою програмою "ENSFITTER".

Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили на IBM PC ET з використанням стандартних пакетів прикладних програм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфологічні дослідження показали, що найбільшою радіочутливістю характеризуються кровотворні і лімфоїдні органи (Груздев, 1988, Шубик, 1989).

Аналіз даних по вивченню кількості та співвідношення клітин білої крові дозволив встановити, що опромінення в досліджуваних дозах приводило до зниження кількості лейкоцитів в периферичній крові тварин. Ефект мав дозозалежний характер.

Вивчення співвідношення клітинних елементів крові в контролі і під дією іонізуючої радіації показало, що найбільш виражені зміни характерні для нейтрофілів і лімфоцитів. Кількість нейтрофілів з розвитком пострадіаційної динаміки підвищувалась, а лімфоцитів - знижувалась.

При характеристиці функціонального стану лімфоїдних клітин

тимусу і селезінки щурів ми використовували реакції спонтанного розеткоутворення та бластної трансформації лімфоцитів.

При постановці реакції спонтанного розеткоутворення нами були отримані дані, які свідчать про істотні порушення розеткоутворюючої здатності досліджуваних клітин під впливом іонізуючої радіації (табл.1).

Виявлені зміни були однотиповими як для спленоцитів, так і для тимоцитів. Причому з підвищенням дози опромінення кількість розеток статистично знижувалась. Найбільш значне зниження (на 300 %) розеткоутворюючої здатності нами було відмічено для спленоцитів через 6 годин після опромінення експериментальних тварин в дозі 1 Гр.

Відмічене порушення розеткоутворюючої здатності лімфоцитів в усі періоди спостережень, мабуть, може бути пов'язане з втратою поверхневих рецепторів Т-лімфоцитів. Рання постпроменева зміна рецепторних функцій мембран лімфоцитів є характерною і постійною ознакою їх променевого ураження (Сунгуров, 1988).

При вивченні реакції бластної трансформації лімфоцитів селезінки щурів нами було показано зростання спонтанної ДНК-синтезуючої активності при опроміненні. Максимальний стимулюючий ефект іонізуючого випромінювання (260 %) був виявлений через 6 г після опромінення в дозі 1 Гр (рис.1). Ми досліджували як нестимульовану проліферативну активність лімфоцитів селезінки щурів в умовах одноразового рентгенівського опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр, так і ефект опромінення на фоні стимуляції мітогеном.

Показано, що через 6 г після опромінення в досліджуваних дозах мітогени стимулюють включення ^3H -тимідину в ДНК досліджуваних клітин по-різному. Кон А виявив більш виражену стимулюючу дію (290 %), до того ж ефект зберігався з підвищенням дози опромінення

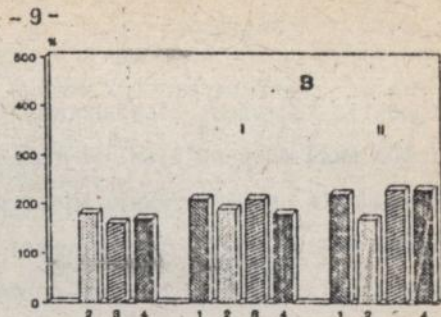
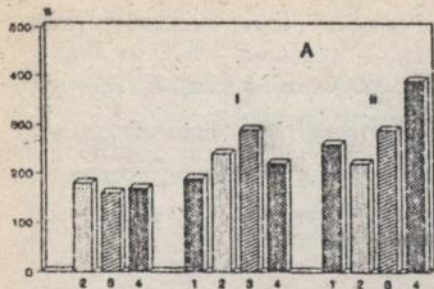


Рис.1. Включення ^3H -метилтимідину в ДНК лімфоцитів селезінки щурів через 6 (А) і 12 (Б) годин після опромінення в дозі 0,5 (I) та 1 Гр (II)

По осі абсцис: 1 - спонтанна ДНК-синтезуюча активність; стимульована - 2 - ФГА; 3 - Кон А; 4 - ЛПС

По осі ординат: % активації проліферативної активності лімфоцитів опроміненням і мітогенами (контроль прийнятий за 100 %).

Таблиця 1.

Кількість Е-розеток, утворених клітинами селезінки і тимусу щурів в пострадіаційній динаміці М±m; n=10

Групи тварин	Термін після опромінення	Тимоцити	Спленоцити
Контроль	6 год	24,7±0,3	26,7±2,4
	12 год	34,2±2,9	20,3±0,6
0,5 Гр	6 год	16,8±2,8*	22,0±4,0
	12 год	25,7±1,7*	11,8±0,7*
1 Гр	6 год	15,3±2,3	9,0±0,9
	12 год	30,0±2,8	13,2±0,4*

* - різниця з контролем вірогідна ($p < 0,05$)

(рис.1). Виявлені відмінності, можливо, обумовлені тим, що Кон А і ФГА впливають на різні субпопуляції лімфоцитів. Преінкубація лімфоцитів з В-клітинним мітогеном (ЛПС) також викликала дозозалежне підсилення проліферативної відповіді (220% при 0,5 і 390% - при 1 Гр). Через 12 г після опромінення в тих же дозах стимулююча дія мітогенів виражена менше. Нами не виявлені відмінності в здатності лімфоцитів до синтезу ДНК при стимуляції клітин різними мітогенами. Це пов'язано, мабуть, з тим, що з розвитком радіаційної динаміки відбуваються структурні та функціональні порушення в лімфоцитах опромінених щурів. Крім того, може змінюватись чутливість клітинних рецепторів безпосередньо до самого мітогену.

Біохімічні реакції, які змінюють метаболізм лімфоцитів, в постпроменевій динаміці вивчені недостатньо. Відомо, що системі циклічних нуклеотидів властивий універсальний характер відповіді на вплив різних екстремальних факторів, в тому числі і опромінення (Федоров, 1979, Соболев, 1987). Тому, можливим підходом до вивчення найбільш радіочутливих ланок даного регуляторного механізму є, з одного боку, вивчення динаміки вмісту цАМФ і цГМФ, регулюючих проліферацію і диференціацію лімфоїдних клітин (Владимиров, 1988); з другого - особливостей функціонування ферментів їх синтезу і гідролізу в лімфоцитах тимуса і селезінки щурів, яких опромінювали одноразово в дозах 0,5 і 1 Гр.

Нами було показано, що опромінення тварин приводить до змін вмісту циклічних нуклеотидів. Після впливу в дозі 0,5 Гр відбувається поступове з часом зниження цАМФ і підвищення цГМФ (в 2 рази) в спленоцитах (табл.2). Подальше підвищення дози опромінення посилювало зниження вмісту цАМФ в усі досліджувані періоди і приводило до зниження рівня цГМФ.

Пострадіаційні зміни вмісту циклічних нуклеотидів (цАМФ та цГМФ в пмоль/10⁷) клітин в лімфоцитах селезінки і тимусу щурів (M±m; n=8).

Групи тварин	Вміст циклічних нуклеотидів					
	спленоцити			тимоцити		
	цАМФ	цГМФ	цАМФ/цГМФ	цАМФ	цГМФ	цАМФ/цГМФ
Контроль	25,5±3,5	1,5±0,3	17,0	11,8±1,8	3,0±0,9	3,7
0,5 Гр						
6 год	21,8±5,8	3,0±0,8*	7,0*	4,5±0,6*	1,5±0,6	3,0
12 год	12,1±3,4*	3,5±1,0*	3,5*	3,5±0,5*	2,1±0,7	1,7*
1 Гр						
6 год	12,8±2,3*	0,8±0,2*	16,0	3,0±0,4*	0,8±0,2*	3,7
12 год	15,6±3,5*	0,6±0,1*	26,0*	12,8±1,7	1,0±0,08*	12,8*

Таблиця 3.

Пострадіаційні зміни активності ферментів синтезу та гідролізу циклічних нуклеотидів в лімфоцитах селезінки щурів (M±m; n=8)

Групи тварин	Активність ферментів пмоль/мін мг белка			
	Аденілат циклаза	Гуанілат циклаза	Асофдиестераза	цАМФ цГМФ
Контроль	30,0± 1,9	1,9±0,2	1668,3±259,5	0,517±0,02
0,5 Гр.				
6 год	61,2±4,9*	6,4±0,3*	4485,7±962,2*	0,668±0,2
12 год	39,1±1,8*	6,2±0,2*	2904,3±28,0*	0,858±0,2
1 Гр				
6 год	29,7±0,6	0,77±0,2*	3504,3±165,4*	0,663±0,1
12 год	30,5±0,5	1,07±0,07*	1121,0±115,0*	0,994±0,01

* - різниця з контролем вірогідна (p < 0,05)

Аналіз даних по вмісту циклічних нуклеотидів в тимоцитах показав, що опромінення приводило до зниження обох метаболітів практично в усі досліджувані дози і строки (табл.2). Можливим поясненням відмінностей в характері змін метаболічної відповіді спленоцитів і тимоцитів на вплив радіації може бути різний популяційний склад клітин досліджуваних органів.

Для нормального функціонування клітин необхідне оптимальне значення співвідношення цАМФ/цГМФ (Кисельгоф, 1992). Згідно одержаних даних, після опромінення тварин в дозі 0,5 Гр відмічається зниження відношення цАМФ/цГМФ в спленоцитах і тимоцитах щурів. Зменшення даного показника вказує на можливе підсилення в клітинах цГМФ-залежного механізму регуляції метаболізму, діючого як позитивний сигнал, який підсилює клітинну проліферацію і пригнічує диференціацію (Муксинова, 1990). Через 12 г після опромінення в дозі 1 Гр відмічено різке збільшення даного показника. Підвищення рівня ендогенного цАМФ може бути причиною гальмування функціональної активності лімфоїдних клітин, що може привести до порушення процесів імунорегуляції (Владимиров, 1991).

Наступним етапом наших досліджень було вивчення активності ферментів, які підтримують концентрації циклічних нуклеотидів в клітині - аденілатциклази, гуанілатциклази і фосфодіестерази цАМФ і цГМФ.

Опромінення в дозі 0,5 Гр приводило до підвищення активності всіх досліджуваних ферментів в спленоцитах (табл.3). Із збільшенням дози зміни в системі цАМФ відбуваються, головним чином, за рахунок збільшення активності фосфодіестерази, а в системі цГМФ - внаслідок зменшення активності гуанілатциклази. Можливо, виявлені в пострадіаційній динаміці зміни вмісту

цАМФ і цГМФ можуть бути пояснені порушеннями в функціонуванні ферментативних систем.

При опроміненні в дозі 1 Гр ступінь порушень в системі цАМФ підсилювався, але був аналогічним при опроміненні в дозі 0,5 Гр (табл.3). Спостерігалось різке зниження активності гуанілатциклази при практично незмінних значеннях активності фосфодіестерази цГМФ.

Порушення, які ми спостерігали в системі циклічних нуклеотидів, можуть викликати відповідні зміни в тих структурних і функціональних білках, активність яких контролюється даними факторами. Важливе місце серед таких білків займають протеїнкази, які здійснюють фосфорилювання білкових субстратів (Северин, 1985).

Відомо, що цАМФ-залежні протеїнкази відіграють важливу роль в регуляції метаболізму в різних тканинах і клітинах, в тому числі і лімфоцитах. Крім того, оскільки при променевому ураженні має місце глибоке порушення метаболічних процесів в лімфоцитах, актуальним є вивчення властивостей і механізмів регуляції цАМФ-залежних протеїнказ в лімфоїдних клітинах селезінки щурів. Опромінення в досліджуваних дозах приводило до зниження ферментативної активності на 32 % і 55 % відповідно.

Вивчення внутрішньоклітинної локалізації ферментативної активності показало, що більша частина активності зосереджена в цитозолі (мембрани : цитозоль - 20% : 80%). Тому нами з розчинної фракції лімфоцитів на колонці з ДЕАЕ-целлюлозою була виділена (лінійним градієнтом калій-фосфатного буфера) і частково очищена цАМФ-залежна протеїнказа. Профілі елюції ферменту, виділеного з контрольних і опромінених тварин, не мали відмінностей. Пік ферментативного препарату елювався з колонки при тій самій іонній силі 0,2-0,3 М калій-фосфатного буфера.

Для подальшого вивчення впливу радіації на систему цАМФ-залежного фосфорилування нами були вибрані оптимальні умови протікання фосфотрансферазної реакції: дослідження залежності активності від часу інкубації і концентрації ферментативного білку показало, що максимальна активність ферменту спостерігалась через 5 хв після початку реакції при концентрації білка 0,05 мг/мл.

Результати досліджень деяких каталітичних властивостей фермента показали, що рентгенівське опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр не викликало змін в залежності активності фермента від концентрації іонів водню: оптимум рН при дослідженні в різних буферних системах зберігався в області 7,2-7,5.

Експериментально доведено, що для активації досліджуваних протеїніназ необхідні різні концентрації цАМФ (Кондратюк, 1992). Одержані нами дані відносно залежності виділеного ферменту від концентрації цАМФ свідчать про те, що з підвищенням концентрації циклічного нуклеотиду до 5×10^{-6} М, активність ферменту максимально зростала як в контролі, так і через 12 г після опромінення в досліджуваних дозах (рис.2). При цьому опромінення в дозі 1 Гр приводило до збільшення активуючої дії циклічного аденозинмонофосфата.

цАМФ-залежна протеїніназа - фермент, який має два субстрати реакції: донор фосфатної групи - АТФ та акцептор фосфату - білок. В системах *in vitro* як білковий субстрат частіше всього використовують гістони (Azhar, 1989). Для досліджуваного ферменту кращим субстратом виявився гістон H2B. Залежність активності ферменту вивчалась в діапазоні концентрацій гістону від 0,1 до 1 мг/мл. Опромінення приводило до суттєвих порушень у взаємодії ферменту з даним субстратом (рис.3). Відбувається зменшення спорідненості фермента до гістона H2B, що приводить в свою чергу до

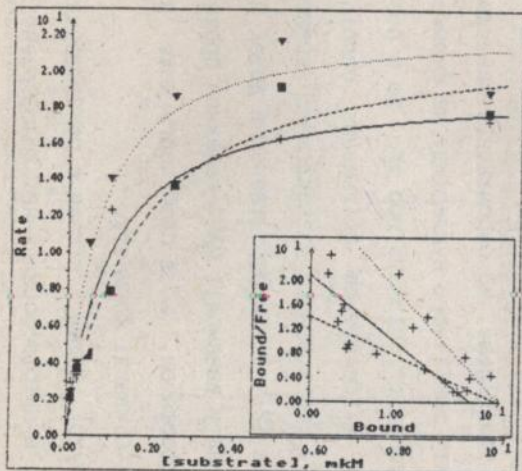


Рис.2. Залежність активності CAMF -залежної протеїнкінази лімфоцитів селезінки контрольних (—) і опромінених в дозі 0,5 Гр (- -) та 1 Гр (...) шурів від концентрації CAMF .

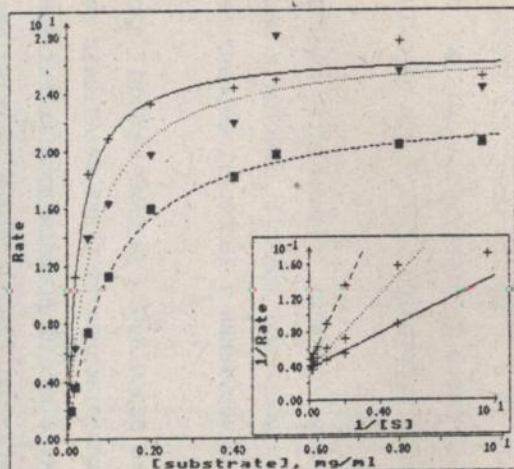


Рис.3. Залежність активності CAMF -залежної протеїнкінази лімфоцитів селезінки контрольних (—) і опромінених у дозі 0,5 Гр (- -) та 1 Гр (...) шурів від концентрації гістону.

зменшення максимальної швидкості фосфотрансферазної реакції.

Вивчення залежності активності А-кінази з лімфоцитів селезінки від концентрації АТФ (від 10 до 100 мкМ), при наявності оптимальних концентрацій білкового субстрату показало, що суттєвих змін у взаємодії з даним субстратом реакції при опроміненні не спостерігається.

Таким чином, головною причиною інактивації цАМФ-залежних протеїнкіназ, виділених з розчинної фракції лімфоцитів селезінки, можуть бути виявлені нами порушення у взаємодії фермента з білковим субстратом.

Дія-рентгенівського опромінення на цАМФ-залежні протеїнкінази також може бути локалізована на рівні механізмів регуляції їх активності. В зв'язку з цим ми провели дослідження функціонування ряду механізмів регуляції цАМФ-залежних протеїнкіназ в умовах променевого враження.

Ми припустили, що важливе значення для регуляції активності цАМФ-залежних протеїнкіназ можуть мати характеристики зв'язування цАМФ з протеїнкіназами, тим більше, що опромінення викликало посилення активуючого ефекту циклічного нуклеотиду на фермент.

Одержані нами результати свідчать про те, що в результаті дії іонізуючої радіації відбувається збільшення спорідненості ферменту до цАМФ (рис.4). Ефект носить дозозалежний характер. Нами встановлено, що через 12 г після опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр відбувається порушення у взаємодії цАМФ-залежних протеїнкіназ з циклічним аденозинмонофосфатом, що в свою чергу може привести до суттєвих змін в функціонуванні ферменту.

Специфічним для другої форми А-кінази є регуляторний механізм, який проявляється в автофосфорилуванні холоферментів (Гри-

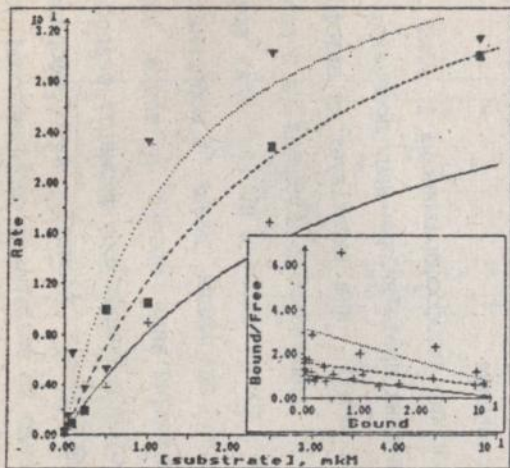


Рис. 4. Залежність зв'язування ^3H -ПААС з ПААС-залежною протеїнкіназою, одержаною з цитосолю лімфоцитів селезінки контрольних (—) і опроміненних в дозі 0,5 Гр (---) та 1 Гр (...) щурів від концентрації ПААС.

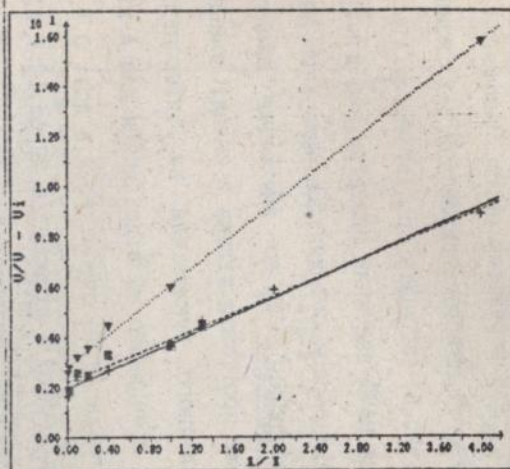


Рис. 5. Залежність автофосфорильовання ПААС-залежної протеїнкінази, одержаної з цитосолю лімфоцитів селезінки контрольних (—) і опроміненних в дозі 0,5 Гр (---) та 1 Гр (...) щурів від концентрації ПААС.

венников, 1981, Rosen, 1975). У випадку протікання процесу автофосфорилування по внутрішньомолекулярному механізму повинна проявлятися інгібуюча дія цАМФ. Для перевірки цього припущення була вивчена залежність інтенсивності автофосфорилування від концентрації цАМФ. Одержані дані (рис.5) свідчать про інгібуючу дію цАМФ на процес автофосфорилування цАМФ-залежних протеїнкіназ в контролі (зв'язування цАМФ з регуляторною субодиницею приводить до дисоціації холофермента на субодиниці, та до зменшення швидкості автофосфорилування, яке може протікати тільки в складі комплексу R_2C_2). Характер впливу циклічного нуклеотида на інтенсивність процесу автофосфорилування принципово не відрізнявся для А-кіназ із лімфоцитів селезінки контрольних та опромінених в дозі 0,5 Гр тварин. Для ферменту, виділеного з лімфоцитів через 12 г після опромінення в дозі 1 Гр, відмічена тенденція до зниження чутливості автофосфорилування до інгібуючої дії цАМФ (рис.5).

Оцінюючи радіочутливість автофосфорилування цАМФ-залежних протеїнкіназ, ми дійшли висновку, що опромінення суттєво не впливає на сам процес автофосфорилування.

При вивченні сумісного впливу автофосфорилування і цАМФ на регуляцію активності цАМФ-залежних протеїнкіназ нами показано, що швидкість фосфотрансферазної реакції, яка каталізується автофосфорильованим ферментом, значно знижується в контролі (в 2 рази) (рис.6). Опромінення приводить до поступового вирівнювання встановленої різниці. Перетворення одержаних даних в координатах Скетчарда дозволило оцінити описаний вище процес з точки зору взаємодії авто- і неавтофосфорильованих форм ферменту безпосередньо з активатором фосфотрансферазної реакції. Автофосфорилування А-кіназ в контролі привело до збільшення спорідненості хо-

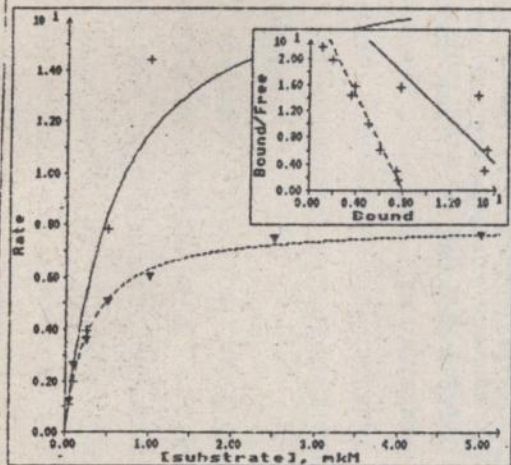


Рис. 8. Залежність фосфотрансферазної реакції від автофосфорильовання холерферменту в контролі; фосфоформа (- -), дефосфоформа (—).

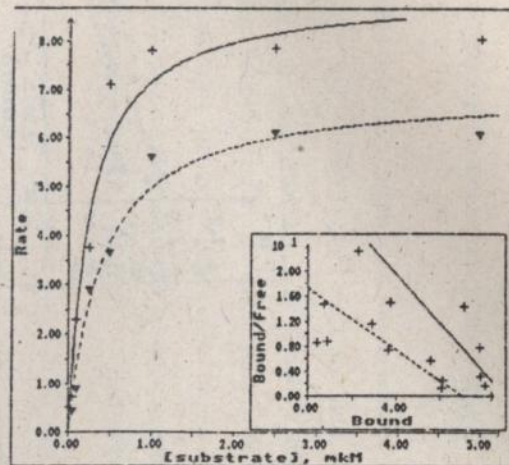


Рис. 9. Залежність фосфотрансферазної реакції від автофосфорильовання холерферменту при опроміненні в дозі 0,5 Гр; фосфоформа (- -), дефосфоформа (—).

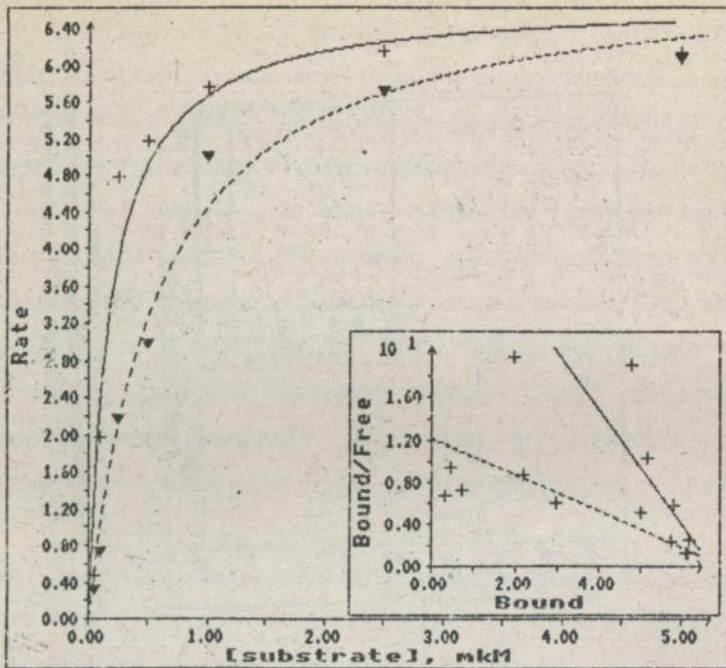


Рис. 6. Залежність фосфотрансферної реакції від автофосфорилування холоферменту при опроміненні в дозі 1 Гр; фосфоформа (- -), дефосфоформа (—).

лоферменту до цАМФ (рис.6). При опроміненні цей процес носить діаметрально протилежний характер (рис.7,8). Зі зростанням дози спорідненість автофосфорильованого холоферменту до активатора різко знижується.

Проводячи аналіз отриманих експериментальних даних по вивченню впливу рентгенівського опромінення на функціонування цАМФ-залежного фосфорильовання в лімфоцитах щурів, слід відмітити, що цей процес порушується в пострадіаційний період. Основним вкладом в виявлені після опромінення зміни є порушення взаємодії ферменту з білковим субстратом фосфорильовання та основним активатором фосфотрансфераазної реакції - циклічним аденозинмонофосфатом.

ВИСНОВКИ

1. Тотальне рентгенівське опромінення тварин в дозах 0,5 і 1 Гр приводить до суттєвих порушень кількості і співвідношення клітин білої крові, а також до зниження розеткоутворюючої здатності лімфоцитів. Ефект залежить від дози радіації.

2. Іонізуюча радіація в досліджуванному діапазоні доз викликає дисфункцію аденілатциклаазної системи, модулюючи активність ферментів, які контролюють внутрішньоклітинну концентрацію циклічних нуклеотидів.

3. Із лімфоцитів селезінки щурів була виділена і частково очищена цАМФ-залежна протеїнкіназа, активність якої через 12 г після тотального рентгенівського опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр знижувалась відповідно на 32 % і 55 %. Під впливом опромінення основні фізико-хімічні та каталітичні властивості цАМФ-залежної протеїнкінази лімфоцитів не змінюються. Спорідненість ферменту до

субстрату фосфотрансферазної реакції - гістону Н 2В знижується. Під дією іонізуючої радіації відбувається залежне від дози випромінювання збільшення спорідненості ферменту до активатора - циклічного аденозинмонофосфату.

4. Опромінення в досліджуваних дозах суттєво не впливає на процес автофосфорилування, але приводить до зниження спорідненості холоферменту до цАМФ (при опроміненні в дозі 0,5 Гр - у 1,5 рази, в дозі 1 Гр - 3 рази).

5. Зміни функціональної активності лімфоїдних клітин, які відбуваються під впливом тотального рентгенівського опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр, можуть бути викликані порушеннями в функціонуванні аденілатциклазної системи та системи цАМФ-залежного фосфорилування - найважливіших систем регуляції метаболізму в клітині.

СПИСОК РОБІТ, НАДРУКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Нальовіна О.Є., Остапченко Л.І., Кучеренко М.Є. Вплив іонізуючого опромінення на морфофункціональний стан клітин імункомпетентних органів щурів // Вісник КУ. - 1993. - N25. - С.6-10.
2. Нальовіна О.Є., Остапченко Л.І., Кучеренко М.Є. Вплив іонізуючого опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр на деякі показники кровотворення та імунітету // Міжнародна наук. конференція. "Навколишнє середовище і здоров'я". - Чернівці, 22-25 листопада 1993р., Тез. доповід., С.118.
3. Налевина О.Е., Остапченко Л.И., Кучеренко Н.Е. Влияние ионизирующего облучения на морфофункциональное состояние клеток иммунокомпетентных органов крыс // Радиобиол. сб-

езд. - Киев, 20-25 сент.1993г., Тез.докт., Ч.2.-
С.704-705.

4. Ручко М.В., Остапченко Л.И., Налевина О.Е., Кучеренко Н.Е. Влияние различных доз ионизирующего излучения на функциональную активность и механизмы активации лимфоидных клеток тимуса и селезенки крыс при воздействии стимулирующего сигнала // Радиц.биол. и радиоэкол. - 1994. - 34, N 1. - С.247-250.
5. Остапченко Л.И., Налевина О.Е., Пархомец Т.И. Вплив іонізуючого опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр на функціональну активність компонентів циклонуклеотидзалежних систем регуляції метаболізму щурів // 1-й з'їзд Укр.бісфіз.товар. - Київ, 1994г., Тез.доповід., С.179-180.
6. Кучеренко М.С., Остапченко Л.И., Налевина О.Е., Долішняк О.І., Попова Є.М. Вивчення чутливості циклонуклеотидзалежних протеїнкіназ до дії патогенних факторів // Доп.АН України. - 1994. - N10. - С.133-134.
7. Остапченко Л.И., Налевина О.Е., Пархомец Т.И. Пострадиационные нарушения в системе циклических нуклеотидов лимфоцитов селезенки и тимуса крыс // Укр.биох.журн. - 1994. - 67,N1. - С.70-75.

Nalyovina O.E. Influence of X-ray radiation on maintenance of cyclic nucleotides and activity of cAMP-dependent protein kinase in rats's lymphoid cells (manuscript).

The dissertation work for degree candidate of biological sciences (speciality 03.00.08. - radiobiology), institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of Ukrainian NAS, Kiev, 1995.

In seven scientific works, having been spoken in support of, we can find information about influence of X-ray irradiation upon the system of cAMP-dependent phosphorylation in lymphoid cells of rats's spleen. It's determined that revealing of alterations of lymphocytes function activity may be evoked by violations of adenylatcyclase system's and the system of cAMP-dependent phosphorylation functions.

Налевина О.Е. Влияние рентгеновского излучения на содержание циклических нуклеотидов и активность цАМФ-зависимых протеинкиназ в лимфоидных клетках крыс (рукопись).

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.08. - радиобиология, Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им.Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 7 научных работ, в которых содержатся данные о воздействии общего рентгеновского облучения в дозах 0,5 и 1 Гр на систему цАМФ-зависимого фосфорилирования в лимфоидных клетках селезенки крыс. Установлено, что выявленные изменения функциональной активности лимфоцитов могут быть вызваны нарушениями в функционировании аденилатцикласной системы и системы цАМФ-зависимого фосфорилирования.

Ключові слова : функціональна активність лімфоцитів, цАМФ-залежна протеїнкіназа, механізми регуляції активності ферментів.

453202

AB 33.647

AB 33.647