

КНІВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ОСТАПЧЕНКО ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА

**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ФУНКЦІОНУВАННЯ
СИСТЕМ БІЛКОВОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ В ЛІМФОЦИТАХ
СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ В УМОВАХ РАДІАЦІЙНОГО ВПЛИВУ**

03.00.04 — біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

**дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

Київ — 1997



00738177 (X)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії фізико-хімічної біології кафедри біохімії біологічного факультету Київського університету ім. Тараса Шевченка

НАУКОВИЙ
КОНСУЛЬТАНТ:

член-кор. НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Кучеренко Микола Євдокимович

ОФІЦІЙНІ ОПОНЕНТИ:

доктор медичних наук, професор
Барабой Вілен Абрамович

доктор біологічних наук
Федоров Олексій Миколайович

доктор біологічних наук
Калінін Федір Леонтійович

ПРОВІДНА УСТАНОВА:

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України

Захист дисертації відбудеться «2.» липень 1997 р.
о 14 год. на засіданні спеціалізованої Вченої ради Д 01.01.07
при Київському університеті ім. Тараса Шевченка за адре-
сою: 252127, м. Київ, проспект Глушкова, 2, корпус 12 (біо-
фак), ауд. 215.

Поштова адреса: 252033, Київ-33, вул. Володимирська, 64,
спецрада Д 01.01.07, біологічний факультет.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці універ-
ситету.

Автореферат розісланий «2.» липень 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук,
професор

О. В. БРАЙОН

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Одним з важливих питань сучасної біологічної науки є біохімічні основи клітинної регуляції (Северін, 1985). Сьогодні досягнуті великі успіхи у вивченні фізико-хімічних механізмів дії багатьох біорегуляторів: виділені у гомогенному стані регуляторні ферменти, рецептори гормонів, вивчені процеси їх активації, проведений аналіз структури активних центрів зв'язування різноманітних компонентів систем регуляції тощо (Кухар, 1991). Все це є базою для комплексного дослідження регуляторних процесів, що мають місце в живій клітині та керують її функціонуванням.

Фосфорилювання являє собою найбільш поширений спосіб посттрансляційної ковалентної модифікації клітинних білків і регуляції їх активності. Воно є ключовим кінцевим ефектом активації внутрішньоклітинних месенджерних систем і відбувається у відповідь на дію на клітину зовнішніх стимулів - нейромедіаторів, гормонів, факторів росту тощо [Nishikawa, 1984]. Процес фосфорилювання, який здійснюється системою протеїназ, інтегрує свою дію основні метаболічні шляхи [Hanks, 1988], контролюючи транспорт іонів [Furukawa et al, 1989], активність циклавної системи [Weiner et al, 1984], експресію генів [Kovacs, 1989] і, крім того, бере активну участь в реалізації великої кількості функціональних та патологічних відповідей клітини. Вивчення механізмів порушень в функціонуванні систем фосфорилювання при різних патологічних станах організму є актуальним і важливим питанням сучасних наукових досліджень.

В останній час особливий інтерес викликає постпроменева па-

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

тологія лімфоїдних клітин, які є найбільш радіочутливими. Пошкодження їх функцій та міграційних властивостей є причиною виникнення та розвитку імунodefіциту. Питання про природу фізико-хімічних процесів, які приводять до біохімічних та морфологічних порушень в лімфоїдних клітинах після дії радіації, до зміни їх функціональної активності, або до пострадіаційного відновлення, ще не вирішене до кінця. Тому вивчення молекулярних механізмів функціонування найбільш універсальної системи регуляції клітинного метаболізму - циклонуклеотид- та Ca^{2+} - залежного фосфорилування лімфоцитів в умовах променевого ураження може відігравати важливу роль у пошуку причин, які приводять до пострадіаційного порушення функціональної активності та навіть до загибелі клітин.

Мета і задачі досліджень. Робота присвячена дослідженню характеру морфофункціональних, фізико-хімічних і біохімічних змін у лімфоцитах в процесі реалізації неспецифічної адаптаційної відповіді клітинної системи на дію променевого фактора. Метою даного дослідження було визначення основних закономірностей та механізмів радіаційної модифікації отрунотворно-функціонального стану систем фосфорилування лімфоцитів селевінки після рентгенівського опромінення шурів в дозах 0,5 та 1 Гр. Для досягнення поставленої мети до завдань роботи входило:

- визначення взаємозв'язку ультраструктурних та біохімічних змін плазматичної мембрани лімфоцитів шурів в умовах опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр;

- в'ясування характеру пострадіаційних змін у системі обміну циклічних нуклеотидів у лімфоцитах селевінки;

- дослідження чутливості різних систем фосфорилування до дії променевого фактора;

- вивчення особливостей механізму ураження cAMP-, cGMP-, Ca^{2+} ,

фосфоліпід- та Ca^{2+} , кальмодулінзалежних систем фосфорилування лімфоцитів селезінки щурів після опромінення тварин;

-аналіз постпроменевих порушень в функціонуванні систем фосфорилування лімфоцитів та виявлення найбільш радіочутливих ланок цього процесу.

Наукова новизна результатів. Виявлені закономірності зміни морфофункціональних і біохімічних властивостей лімфоїдних клітин не тільки доповнюють та розширюють існуючі уявлення, але й віддзеркалюють нові досягнення у вивченні молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітин. Отримані дані істотно доповнюють існуючі уявлення щодо біохімічних аспектів неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи, який виникає у відповідь на дію радіації. Принципове значення мають такі основні результати та висновки:

Вперше здійснено комплексне дослідження структури та регуляції метаболічних процесів лімфоцитів селезінки щурів після тотального рентгенівського опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр.

Вперше встановлена різниця пострадіаційних порушень функціонування між циклонуклеотидзалежними системами фосфорилування лімфоцитів селезінки.

Вперше дана всебічна характеристика 4-х внутріклітинних систем фосфорилування в лімфоцитах щурів в контролі і в умовах впливу радіації.

Вперше показано, що радіація в досліджуваному діапазоні доз викликає дисфункцію аденілатциклазної системи, модулюючи активність ферментів, які контролюють внутрішньоклітинну концентрацію циклічних нуклеотидів.

Вперше із лімфоцитів селезінки щурів виділено, очищено та охарактеризовано фізико-хімічні та каталітичні властивості cAMP-,

сГМР-, Ca^{2+} , фосфоліпід та Ca^{2+} , кальмодуліназалежних протеїнкіназ.

Вперше доведено, що опромінення не впливає суттєво на фізико-хімічні властивості досліджуваних ферментів, але процес взаємодії протеїнкіназ з основними субстратами фосфотрансферазної реакції порушується після дії радіації.

Показано, що тотальне рентгенівське опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр приводить до найбільш суттєвих порушень в механізмах регуляції ферментативної активності - у процесах автофосфорилування та взаємодії колоферментів з основними модуляторами активності.

Приведені дані свідчать про кооперативні зміни в молекулярних структурах та механізмах метаболізму клітин, які мають місце в лімфоцитах селезінки щурів після тотального рентгенівського опромінення в сублетальних дозах.

Практична значимість роботи. Отримані результати сприяють більш глибокому розумінню молекулярних механізмів порушення регуляції метаболічних процесів в лімфоцитах після дії іонізуючої радіації. Експериментальні дані розширюють та доповнюють сучасні уявлення щодо пострадіаційних змін в циклонуклеотид- та кальцій-залежних системах фосфорилування білків. На основі виявлених порушень морфофункціонального стану лімфоцитів та основних регуляторних ланок клітинного метаболізму можливо розробити засоби цілеспрямованого їх ушкодження та корекції. Результати можуть бути вастосовані у пошуках нових радіопротективних та радіотерапевтичних засобів.

Положення, які вносяться на захист.

1. Під впливом опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр відбуваються суттєві порушення ультраструктури та морфофункціонального стану лімфоцитів селезінки щурів, на що вказують зміни в ядрі, цитоп-

лазі, в стані структурних компонентів мембран, у пригніченні розеткоутворюючої здатності і зростанні бластотрансформації.

2. Пострадіаційна дисфункція аденілатциклазної та гуанілатциклазної системи супроводжується залежним від дози пригніченням активності cAMP- та cGMP-залежних протеїнкіназ, порушенням їх спорідненості до субстратів фосфотрансферазної реакції та її активаторів - cAMP і cGMP.

3. Процеси регуляції активності Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної і Ca^{2+} , кальмодулінзалежної протеїнкіназ в лімфоцитах є найбільш радіочутливою ланкою, порушення функціонування якої приводить до пострадіаційних змін активності досліджуваних ферментів.

4. З урахуванням внеска різних систем фосфорилування в рівень загальної протеїнкіназної активності в лімфоцитах селезінки шурів, а також ступеня радіочутливості кожної з них було проведено математичне моделювання можливих наслідків впливу опромінення на імунокомпетентні клітини і міри участі досліджених нами систем у формуванні неспецифічної адаптаційної реакції лімфоцитів у відповідь на дію радіації.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи були представлені і повідомлені на Міжнародній науковій конференції "Імунний статус людини та радіація" у Гомелі, 1991 р.; на 7 Міжнародній науковій конференції по спектроскопії біополімерів у Харкові, 1991 р.; на радіобіологічному в'їзді у Києві, 1993 р.; на 1 Українському біофізичному в'їзді, Київ, 1994 р.; на Міжнародній науковій конференції "Навколишнє середовище і здоров'я" у Чернівцях, 1993 р.; на Міжнародній конференції "Радіація та здоров'я" у Шиві (Ізраїль), 1996 р.

Впровадження. Матеріали дисертаційної роботи використовуються в курсах лекцій "Радіаційна біохімія", які читаються на біологіч-

ному факультеті Київського Університету ім. Тараса Шевченка.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 27 наукових робіт.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів роботи та їх обговорення, заключення, висновків, описка літератури, що складається з 428 робіт. Дисертація викладена на 288 стор., має у своєму складі 33 рисунків, 16 таблиць.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

В дослідженнях використовували білих щурів обох статей вагою 130-150 г. Тварин опромінювали на установці РУМ-17 в дозах 0,5 та 1 Гр за умов: потужність дози в повітрі 24,5 оГр/хв, фільтри 0,5 мм (Cu+Al), напруга 200 кВ, сила струму 5 мА, відстань до поверхні шкіри тварин - 50 см. Тварин декапітували в досліджувані отроки після опромінення та вилучали тимус і селезінку.

Лімфоцити отримували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficoll-Paque (густина 1,077) за методом (Boyum, 1988).

Ультраструктуру одержаних клітин досліджували за методом (Хоменко, 1991).

Оцінку стану структурних компонентів мембран лімфоцитів за допомогою флуоресцентного зонду АНС проводили як запропоновано (Владимиров, Добрецов, 1980).

Дослідження функціональної активності нуклеїнових кислот лімфоцитів селезінки методом лімінесцентної мікроскопії з використанням акридинового оранжевого проводили як описано в роботі (Rigler, 1966).

Функціональну активність лімфоцитів оцінювали в реакціях Е-роветкоутворення за методом (Jondal, 1972) і бластотрансформації

за методом (Кнох, 1982). Клітини ($2 \cdot 10^6$ кл/мл) інкубували з мітогенами: конканавалін А "Sigma" (Кон А) у концентрації 10 мкг/мл, фітогемогліутінін "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 (Лаваревич, 1979). Активність гуанілатциклази визначали за методом послідовної хроматографії на колонках з Dawex (Nakasawa, 1976). Активність аденілатциклази визначали за методом (White, Zenzer, 1974).

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

Визначення активності А-кінази проводили за методом (Gill, Walton, 1979).

Вивчення зв'язування ^3H -cAMP з А-кіназами та автофосфорилування проводили за методом (Ульмасов, 1980).

Виділення препарату cGMP-залежних протеїнкіназ з лімфоцитів проводили з врахуванням рекомендацій (Lincoln, 1977). Ферментативний білок елюювався з колонки з ДЕАЕ-Б2 целюлозою нелінійним градієнтом концентрації (30 мм, 60 мм) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Активність G-кінази визначали за методом (Gill, Walton, 1979), автофосфорилування проводили як рекомендовано в роботі (Aitken, 1984).

Препарат Ca^{2+} , кальмодулінзалежної протеїнкінази був отриманий за методом (Sato, 1990), активність KM-кінази визначали як рекомендовано (Sato, 1990), автофосфорилування проводили за методом (Ikeda, 1991).

Активність усіх досліджуваних протеїніназ визначали по включенню ^{32}P в (γ - ^{32}P) в білкові субстрати фосфотрансферазної реакції. Радіоактивність вимірювали в толуольному сцинтиляторі ЖС-103 на рідинно-сцинтиляційному лічильнику. Питому активність ферментів виражали в пмоль ^{32}Pn за 1 хвилину на 1 мг білка.

Визначення гідродинамічних розмірів часток препаратів Ca^{2+} та циклонуклеотидзалежних кіназ проводили методом лазерної кореляційної спектроскопії (Лебедев та ін., 1987). Дослідження проводили на установці "Malvern-4700" (Англія).

Ідентифікацію субстратів фосфорилування проводили методом гелі-електрофорезу, який було запропоновано (Laemmli, 1970).

Визначення білка в препаратах різної природи проводили за методом (Lowry, 1951) та (Bradford, 1976).

Кінетичну обробку результатів проводили за модифікованою програмою "ENSFITTER". Статистичну обробку результатів та перебудову графіків проводили на IBM PC ET з використанням стандартних пакетів прикладних програм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Нами з селезінки щурів методом центрифугування на градієнті фікол-верографіну (Boyum, 1968) була виділена клітинна суспензія, ультраструктура якої була проаналізована і охарактеризована методом електронної мікроскопії.

Показано, що виділені нами з селезінки щурів клітини представлені, в основному, гомогенною за радіочутливістю субпопуляцією лімфоцитів, у яких виявлені значні пострадіаційні зміни ядра та цитоплазми.

Для оцінки стану структурних компонентів мембран лімфоцитів ми використовували зонд АНС, флюоресценція якого сильно змінюється

ся при зв'язуванні з білком (Баглаев, 1986, Горбенко, 1995).

Нами показано, що при дії радіації інтенсивність флуоресценції порушується. Причому пострадіаційна динаміка цього показника зі збільшенням дози випромінювання змінюється.

Найбільш виражена зміна інтенсивності флуоресценції АНС відмічена через 12 годин після опромінення у дозі 1 Гр. Встановлені нами зміни в мембранах можуть бути зв'язані з порушенням бар'єрної функції ліпідного бішару і, у першу чергу, зі змінами в процесах перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), котрі, як показано раніше (Петрик, 1995, Кучеренко, 1991), активуються в лімфоцитах у межах досліджуваних нами доз, але не проявляють при цьому дозової залежності.

З пострадіаційними порушеннями в мембранах лімфоцитів тісно зв'язані різні внутрішньоклітинні процеси. В цьому аспекті суттєвої ваги набуває дослідження функціональної активності нуклеїнових кислот лімфоцитів, які є невід'ємною ланкою однієї із важливіших адаптивних систем організму, яка контролює та регулює гомеостаз на клітинному, субклітинному та молекулярному рівні (Новикова, 1993). Для цієї мети широко застосовується метод люміноцентної мікроскопії з використанням акридинового оранжевого (АО).

Нами були визначені значення параметра α (співвідношення інтенсивностей червоної та зеленої люмінесценції АО, що дає змогу оцінити долі одно- та двоспіральних ділянок у ДНК та РНК) для лімфоцитів селезінки щурів у контролі та після опромінення тварин у дозах 0,5 та 1 Гр, котрі склали $1,9 \pm 0,4$; $1,0 \pm 0,5$; $3,0 \pm 0,4$ відповідно. Статистично значиме збільшення в 1,8 рази α встановлене після опромінення в дозі 1 Гр, що вказує на дисбаланс синтетичних процесів у досліджуваних нами клітинах. Збільшення α , ймовірно, зв'язане з інтенсифікацією синтетичної активності в

уражених імунокомпетентних клітинах у відповідь на надходження у кров ауто- та гетероантигенів у результаті променевого впливу (Карнаухова, 1994).

Таким чином, виявлені нами зміни в ультраструктурі мембран та синтетичному апараті лімфоцитів селезінки щурів після дії рентгенівського випромінювання в дозах 0,5 та 1 Гр дозволяють припустити виникнення пострадіаційних порушень функціональної активності досліджуваних клітин.

Для характеристики функціонального стану лімфоїдних клітин щурів нами були використані реакції спонтанного роеткоутворення та бластної трансформації лімфоцитів (табл. 1).

Роеткоутворююча здатність Т-лімфоцитів суттєво знижувалася при опроміненні. Ефект мав дозовалежний характер. Найбільш виражене зниження (в 3 рази) було відмічене для спленоцитів через 6 годин після впливу в дозі 1 Гр.

Відмічене порушення роеткоутворюючої здатності лімфоцитів у всі строки спостережень, мабуть, може бути пов'язане з втратою певних поверхневих рецепторів Т-лімфоцитів. Можна припустити, що рання патологія поверхні лімфоцитів може бути одним із найважливіших факторів наступної деградації цих клітин. При вивченні реакції бласттрансформації лімфоцитів нами було показано збільшення спонтанної ДНК-синтезуючої активності в лімфоцитах селезінки щурів при опроміненні; це може бути обумовлене компенсаторною реакцією підсилення проліферативної активності лімфоїдних клітин (рис. 1).

У діапазоні доз 0,5 та 1 Гр досліджувалась здатність Т- та В-лімфоцитів із селезінки опромінених щурів активуватись при додаванні в середовище культивування Т- та В-клітинних мітогенів. Нами було показано, що через 6 годин після опромінення мітогени

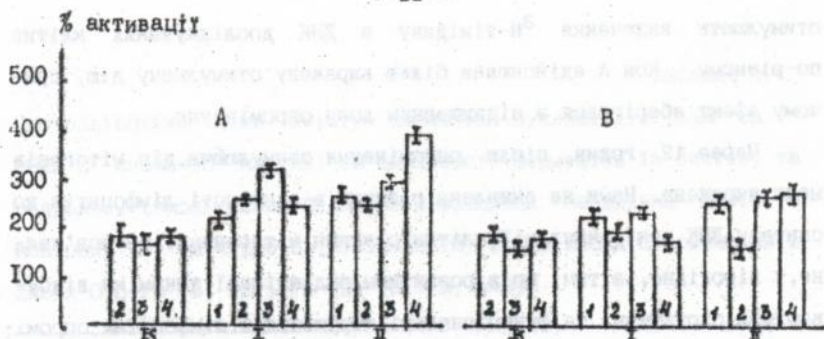


Рис. Включення ^3H -метилтимідину в ДНК лімфоцитів селезінки щурів через 6 /А/ і 12 /В/ годин після опромінення в дозі 0,5 /І/ та 1,0 Гр/ІІ/-спонтанна ДНК-синтезуюча активність; 2 - стимульована ФГА; 3 - Кон; 4 - ЛПС.

Таблиця 1.

Кількість Е-роаєток, утворених клітинами селезінки і тимусу щурів в пострадіаційній динаміці $M \pm m$; $n = 10$.

Групи тварин	Термін після опромінення	Тимоти	Спленоти
Контроль	6 годин	$24,7 \pm 0,3$	$26,7 \pm 2,4$
	12 годин	$34,2 \pm 2,9$	$20,3 \pm 0,6$
0,5 Гр	6 годин	$16,8 \pm 2,8$	$22,0 \pm 4,0$
	12 годин	$25,7 \pm 1,7^*$	$11,8 \pm 0,7^*$
1 Гр	6 годин	$15,3 \pm 2,3$	$9,0 \pm 0,9$
	12 годин	$30,0 \pm 2,8$	$13,2 \pm 0,4^*$

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

стимулюють включення ^3H -тімідину в ДНК досліджуваних клітин по-рівному. Кон А здійснював більш виражену стимулюючу дію, причому ефект зберігався з підвищенням дози опромінення.

Через 12 годин після опромінення стимулююча дія мітогенів менш виражена. Нами не виявлена різниця в адгезивності лімфоцитів до синтезу ДНК при стимуляції клітин різними мітогенами. Це пов'язане, вірогідно, 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 мітогена (Сунгуров, 1988).

Отримані нами дані про порушення морфофункціональних властивостей лімфоцитів при дії іонізуючої радіації в дозах 0,5 та 1 Гр, а також результати, отримані раніше (Сировец, 1992; Петрик, 1995; Александров, 1996), які свідчать про суттєві зміни у складі метаболітів, здатних брати участь у формуванні сигналу на рівні зовнішньої мембрани лімфоїдних клітин, послужили базою для проведення наших подальших досліджень по вивченню особливостей функціонування однієї з найважливіших систем регуляції метаболізму клітини - системи циклічних нуклеотидів.

Враховуючи універсальний характер відповіді системи циклічних нуклеотидів на дію різних екстремальних факторів, в тому числі і опромінення (Соболев, 1987), можливим підходом до в'ясування найбільш радіочутливих ланок даного регуляторного механізму являється вивчення динаміки вмісту cAMP та cGMP, які регулюють проліферацію і диференціювання лімфоїдних клітин (Федоров, 1979), а також особливості функціонування ферментів їх синтезу та гідролізу в лімфоцитах селезенки щурів, що піддавались однократному загальному опроміненню в дозах 0,5 та 1 Гр (табл. 2).

Таблиця 2.

Пострадіаційні зміни вмісту циклічних нуклеотидів (сАМР та сГМР в $\text{пмоль} \cdot 10^7$ клітин) та активності ферментів їх синтезу та гідролізу ($\text{пмоль/хв} \cdot \text{мг}$ білку) в лімфоцитах селезінки щурів в контролі (1) та через 6 (А) та 12 (В) годин після опромінення в дозах 0,5 Гр (2) та 1 Гр (3) ($M \pm m$; $n=8$).

Стан	Вміст циклічних нуклеотидів			Активність ферментів			
	сАМР	сГМР	сАМР/сГМР	АД	ГЦ	ФДБ	
1	25,5 $\pm$ 3,5	1,5 $\pm$ 0,3	17,0	30,0 $\pm$ 1,9	1,9 $\pm$	1668,3 $\pm$	0,517 $\pm$
					0,2	259,5	0,02
2А	21,8 $\pm$ 5,8	3,0 $\pm$ 0,8*	7,0*	81,2 $\pm$ 4,9*	8,4 $\pm$	4485,7 $\pm$	0,868 $\pm$
					0,3*	762,2*	0,2
В	12,1 $\pm$ 3,4*	3,5 $\pm$ 1,0*	3,5*	39,1 $\pm$ 1,8*	6,2 $\pm$	2904,3 $\pm$	0,858 $\pm$
					0,2*	28,0*	0,2
3А	12,8 $\pm$ 2,3*	0,8 $\pm$ 0,2*	16,0	29,7 $\pm$ 0,6	0,77 $\pm$	3504,3 $\pm$	0,863 $\pm$
					0,2*	165,4*	0,1
В	15,6 $\pm$ 3,5*	0,6 $\pm$ 0,1*	26,0*	30,5 $\pm$ 0,5	1,07 $\pm$	1121,0 $\pm$	0,994 $\pm$
					0,07*	115,0*	0,01

* $p < 0,05$, в порівнянні з контролем.

Нами було показано, що опромінення тварин приводить до змін у складі циклічних нуклеотидів. Після дії радіації в дозі 0,5 Гр відбувається поступове, залежне від часу, зниження cAMP та підвищення cGMP (у 2 рази) в спленоцитах. Підвищення дози опромінення поглиблювало зниження складу cAMP у всіх досліджуваних отроки та приводило до зниження рівня cGMP.

Значне підвищення рівня cGMP та зниження рівня cAMP через 12 годин після дії радіації в дозі 0,5 Гр корелює з підвищенням концентрації вільного внутрішньоклітинного Ca^{2+} , який, в свою чергу, є модулятором активності ферментів циклазної системи (Ручко, 1991).

Для нормального функціонування клітин необхідно мати оптимальне співвідношення cAMP/cGMP.

Згідно отриманим даним, після опромінення тварин у дозі 0,5 Гр відмічається зниження в спленоцитах відношення cAMP/cGMP. Зменшення даного показника вказує на можливе підсилення у клітинах cGMP-залежного механізму регуляції метаболізму, діючого як позитивний сигнал, що підсилює клітинну проліферацію та подавляє диференціювання. Через 12 годин після опромінення у дозі 1 Гр відмічене різке збільшення даного показника. Підвищення рівня ендогенного cAMP може бути причиною гальмування функціональної активності лімфоїдних клітин, що може привести до порушення процесів імунорегуляції.

Вивчення активності ферментів, які підтримують концентрації циклічних нуклеотидів у клітині-аденілатциклази, гуанілатциклази та фосфодіестерази cAMP і cGMP показало, що опромінення у дозі 0,5 Гр приводило у рівній мірі до підвищення активності всіх досліджуваних ферментів у спленоцитах. Зі збільшенням дози порушення

в системі cAMP зміщені в бік фосфодіестерази, а в системі cGMP - в бік гуанілатциклази. Мабуть, виявлені в пострадіаційній динаміці зміни у складі cAMP і cGMP можуть бути пояснені порушеннями в функціонуванні ферментативних систем (табл. 2).

Після того, як були встановлені коливання у складі таких вторинних месенджерів, як цитоплазматичний Ca^{2+} (Ручко, 1991), cAMP та cGMP в лімфоцитах селезінки в пострадіаційний період, виникла необхідність дослідження механізмів реалізації ефектів цих посередників на клітину. Універсальним механізмом цієї реалізації, як відомо, є ферментативне фосфорилування різних білкових субстратів, яке здійснюється системою протеїнкіназ (Greengard, 1982).

Для з'ясування відносного вкладу в процеси фосфорилування білків лімфоїдних клітин різних систем фосфорилування, їх порушення після опромінення тварин, була досліджена динаміка cAMP-залежного, cGMP-залежного, Ca^{2+} , фосфоліпід- та Ca^{2+} -кальмодулінзалежного фосфорилування в лімфоцитах селезінки та тимоцитах після впливу на тварин іонізуючої радіації в дозах 0,5 і 1 Гр. Результати даного дослідження виявили порушення в функціонуванні всіх систем білкового фосфорилування.

Іонізуюча радіація в дозах 0,5 і 1 Гр діяла однонаправлено на системи циклонуклеотидзалежного і КМ-залежного фосфорилування, але відрізнялась за своєю дією у випадку протеїнкінази С. Через 12 годин після опромінення тварин спостерігалась протилежна зміна активності протеїнкінази С при дії цих двох доз - активація фосфорилування при опроміненні тварин у дозі 0,5 Гр і пригнічення у випадку дії радіації в дозі 1 Гр.

Активність Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінази в лімфоїдних клітинах контрольних тварин набагато перевищувала активність

циклонуклеотидзалежних протеїніназ, що може свідчити про більшу значимість Ca^{2+} , фосфоліпідзалежного фосфорилування білків для лімфоцитів. Порушення, які спостерігаються саме в цій системі білкового фосфорилування після променевого впливу, можуть мати визначальне значення в функціонуванні лімфоїдних клітин.

Вивчення внутрішньоклітинної локалізації Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнінази в лімфоцитах контрольних тварин показало, що більша частина (65%) ферментативної активності приходилась на цитозольну фракцію фермента. Опромінення тварин у дозах 0,5 та 1 Гр не приводило через 6 та 12 годин до суттєвих змін локалізації активності протеїнінази С в клітинах. Таким чином, було показано, що зміни активності фермента, які спостерігались у результаті променевого впливу на тварин, не зв'язані зі зміною внутрішньоклітинного розподілу протеїнінази С. Ca^{2+} , фосфоліпідзалежна протеїніназа була виділена через 12 годин після опромінення тварин у дозах 0,5 і 1 Гр з цитозольної фракції лімфоцитів.

Фермент елюювався з колонки у вигляді одного піка в інтервалі 0,18-0,22 М NaCl. Умови елюції не змінилися після опромінення тварин у дозах 0,5 і 1 Гр. Питома активність частково очищеного препарату протеїнінази С з клітин тварин, які піддавались променевому впливу в дозі 0,5 Гр, була вищою на 50% від контрольних значень, а при опроміненні в дозі 1 Гр активність фермента була нижчою від контрольного рівня на 14%.

Результати дослідження ряду фізико-хімічних і каталітичних властивостей протеїнінази С показали, що рентгенівський вплив на тварин у дозах 0,5 і 1 Гр не викликав змін гідродинамічних розмірів часток препарату фермента, а також не змінював залежності активності фермента від концентрації іонів водню. рН-оптимум протеїнінази С зберігався в області 7,6-7,8. В той же час трохи змі-

нивалась температурна залежність фосфотрансферазної реакції після опромінення тварин у дозі 1 Гр. При цьому в 1,5 рази зростала енергія активації фермента.

Питання про природні субстрати протеїнкінази С до цього часу стоять перед дослідниками, так як існує багато факторів, які ускладнюють пошук фізіологічних субстратів для кожного члена сімейства протеїнкінази С (Nishizuka, 1989). В системах *in vitro* найчастіше як білковий субстрат використовують гістони (Azhar, 1989, Wise, 1982). Проведені нами дослідження субстратної специфічності Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінази і можливого впливу на специфічність фермента опромінення дозволили встановити, що кращим субстратом як у контролі, так і через 12 годин після опромінення тварин у дозах 0,5 та 1 Гр являється гістон H2B. Ми не виявили відмінностей у субстратній специфічності ферментів, отриманих з цитозоля лімфоцитів контрольних і опромінених тварин.

При вивченні кінетичних параметрів фосфотрансферазної реакції нами було виявлено, що уявна константа Міхаеліса і максимальна швидкість реакції для протеїнкінази С по відношенню до гістона H2B не змінювались через 12 годин після дії променевого фактора. В той же час змінювались кінетичні характеристики фермента по відношенню до другого субстрата фосфотрансферазної реакції - АТФ. Так, опромінення тварин у дозі 1 Гр приводило до зниження K_m та до зменшення максимальної швидкості реакції в 1,6 рази. Враховуючи, що навіть невеликі зміни K_m можуть привести до значної зміни ферментативної активності (Хочачка, 1988), зване зниження уявної константи Міхаеліса поряд зі зменшенням максимальної швидкості можуть бути однією з основних причин інактивації протеїнкінази С лімфоцитів селезінки, яка спостерігалась нами через 12 годин після опромінення тварин у дозі 1 Гр (табл. 3).

Таблиця 3.

Кінетичні характеристики С-кінази в лімфоцитах селезінки контрольних та опромінених тварин (М±m; n-3-5).

Значення показників	Контроль	Опромінення	
		0,5 Гр	1 Гр
Км для гістону мг/мл	0,50±0,10	0,66±0,11	0,50±0,07
Км для АТР, мкМ	26,30±3,80	18,0±5,20	19,40±3,00*
Ка для Ca^{2+} , мкМ	2,71±0,29	1,70±0,31*	1,42±0,41*
Ка для - діолеїн	57,80±1,00	16,30±1,30*	26,80±4,00*
фосфа- тидил- серину + діолеїн	33,70±6,30	15,40±0,40*	44,00±6,00
мкг/мл			
Ки для дикаїну, мм	0,14±0,01	0,09±0,01*	0,13±0,03

*p < 0,05, в порівнянні з контролем.

Вивчення залежності швидкості реакції від концентрації Ca^{2+} дозволило нам визначити уявну константу активації протеїнкінази С цим іоном (табл.3). Для фермента в лімфоцитах після опромінення в дозі 0,5 Гр вона знижувалася, що може свідчити про збільшення спорідненості фермента до Ca^{2+} .

Опромінення тварин у дозі 1 Гр приводило до зворотного ефекту - збільшення K_m для Ca^{2+} . Така зміна спорідненості фермента до активуючого агента може привести до збільшення активності Ca^{2+} , фосфоліпідазальної протеїнкінази в першому випадку та до її зниження в другому, що ми і спостерігали при дії на тварин іонізуючої радіації (рис. 2., табл. 3).

Крім іонів Ca^{2+} на активність протеїнкінази С великий вплив здійснюють іони Mg^{2+} та іони Mn^{2+} і Co^{2+} , які заміщають його в деякій мірі. Припускають, що вони можуть здійснювати алостеричну регуляцію фермента або здійснювати вплив на взаємодію фермента з фосфатидилсерином (Bell, 1991). При дослідженні впливу іонів двовалентних металів на активацію протеїнкінази С іонами Ca^{2+} нами було показано, що фермент активується Ca^{2+} лише в присутності іонів Mg^{2+} або Mn^{2+} , але не Co^{2+} , причому міра цієї активації змінювалась при дії на тварин іонізуючою радіацією.

Важливим активатором протеїнкінази С є фосфоліпіди (Гудаб, 1990). При вивченні активуючої дії різних фосфоліпідів ми показали, що опромінення щурів у дозах 0,5 і 1 Гр не змінювало співвідношення активуючих здатностей цих фосфоліпідів, з кращу активуючу дію як в контролі, так і після опромінення виявляв фосфатидилсерин. Нами була визначена константа активації протеїнкінази С для фосфатидилсерину (рис. 2). Дія іонізуючої радіації викликала збільшення спорідненості фермента до цього фосфоліпіду (табл. 3).

Результати дослідів, проведених нами по вивченню впливу опромінення тварин на процес гальмування активності протеїнкінази С дікаїном, також свідчать про виникнення порушень у взаємодії фермента з фосфоліпідами після променевого ураження.

Узагальнення вищевикладених фактів дає можливість зробити висновок про те, що іонізуюче випромінювання в дозах 0,5 і 1 Гр

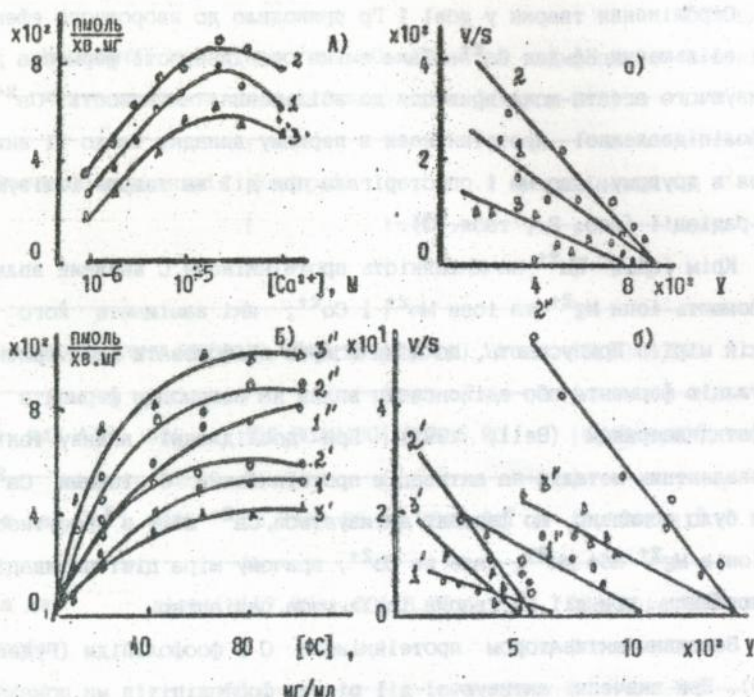


Рис. 2. Залежність активності С-кінази з ліфоцитів селезінки щурів від концентрації Ca^{2+} (А, а) та фосфатидилсерину (Б, б) в контролі (1, 1', 1'') та після опромінення в дозах 0,5 Гр (2, 2', 2'') і 1 Гр (3, 3', 3''):
(1'', 2'', 3'') - у присутності діолектну;
(1', 2', 3') - без діолектну.

викликає багаточисельні порушення в системах регуляції активності Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінази С лімфоїдних клітин селезінки. Активація протеїнкінази С через 12 годин після опромінення тварин у дозі 0,5 Гр може бути обумовлена змінами в регуляторних системах фермента, а саме - збільшенням спорідненості фермента до фосфатидилсерину та іонів Ca^{2+} . Деякий вплив може проявитися і з боку регуляції активності фермента іонами двовалентних металів. Інактивуюча дія опромінення тварин у дозі 1 Гр на протеїнкіназу С може бути наслідком не тільки порушень в системі регуляції фермента, які проявляються у зменшенні його спорідненості до іонів Ca^{2+} та у зміні взаємодії фермента з діацилглицерином, але і наслідком порушень взаємодії протеїнкінази С з АТФ.

Ще одним ферментом, активність якого модулюється Ca^{2+} і який по відносному вкладу в процеси білкового фосфорилування лімфоїдних клітин знаходиться зразу після Ca^{2+} , фосфоліпідзалежного, з Ca^{2+} , кальмодулінзалежна протеїнкіназа.

Дослідження проводили на КМ-залежній протеїнкіназі, яка була виділена через 12 годин після опромінення тварин у дозах 0,5 і 1 Гр із цитозольної фракції клітин і очищена на колонці з ДЕАЕ-целюлозою.

Опромінення в досліджуваних дозах впливало на загальну та питому активність Ca^{2+} , КМ-кінази на всіх етапах виділення ферментативного препарату. За допомогою електрофорезу в DS-Na-поліакриламідному гелі виділеного ферментативного препарату було виявлено 5 зон, які зафарбувалися Кумаворі, електрофоретичні рухомості яких відповідали білкам з Mr 51 кДа, 50 кДа, 21 кДа, 20 кДа і 18 кДа.

Вивчення субстратної специфічності виділеної Ca^{2+} , КМ-кінази проводили в присутності Ca^{2+} і кальмодуліну. Кращим субстратом для фермента з лімфоцитів були легкі ланцюги міозину як у контро-

лі, так і після дії іонізуючої радіації.

Для перебігу фосфотрансферазної реакції, яка каталізується Ca^{2+} , КМ-кіназою, необхідна присутність Mg^{2+} , Ca^{2+} , кальмодуліну. Відсутність одного з цих компонентів веде до блокування реакції фосфорилювання. Вивчення кінетичних властивостей виділеного нами раніше ферментативного препарату проводилось у присутності насичуючих концентрацій білкового субстрата, АТФ і Ca^{2+} . Значення K_m для Ca^{2+} і кальмодуліну були визначені після перетворення залежності активності протеїнкінази від концентрації даних лігандів у достатньо широкому діапазоні (для Ca^{2+} 1-50,0 мкМ, для КМ 0,1-10 нМ) (табл. 4).

Отримані кінетичні характеристики КМ-залежної протеїнкінази з лімфоцитів селезінки дозволяють віднести її до ферментів типу II (табл. 4). На користь цього припущення свідчать отримані константи, які співрозмірні з кінетичними параметрами для КМ-залежних протеїнкіназ типу II в мозку (Bennett, 1987, DeRemer, 1992), скелетних м'язів (Ikebem, 1990), селезінки щурів (Sato, 1990). Крім того для сімейства Ca^{2+} , КМ-кіназ II характерна загальна субстратна специфічність. Для них, як і для фермента в лімфоцитах селезінки, найкращим субстратом є легкі ланцюги міовіну, казеїн, у меншій мірі фосфорилюється фосфорилаза в, сумарна фракція гістонів і практично не фосфорилюється протамін (Sato, 1990).

Рентгенівське опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр суттєво не впливало на взаємодію Ca^{2+} , КМ-кінази з лімфоцитів селезінки щурів з іонами магнію, кальцію, кальмодуліном, АТФ і білковим субстратом фосфотрансферазної реакції. Але, як було вище показано, активність Ca^{2+} , кальмодулінозалежних протеїнкіназ під дією радіації порушується. Вірогідно, це відбувається в результаті радіаційного ураження одного з основних регуляторних механізмів актив-

ності - автофосфорилування холофермента КМ-кінази.

Таблиця 4.

Кінетичні характеристики КМ-кінази в лімфоцитах селезінки щурів в контролі та після дії іонізуючої радіації (Міт; n=3-5).

Параметри	Значення, n = 3+5					
	К	г	50 р	г	100 р	г
КМ, мкМ для білкового субстрату	1,9	0,95	1,2	0,85	3,0	0,98
КМ, для АТР	17,9	0,89	16,8	0,85	15,4	0,93
Ка, для Mg^{2+}	6,3	0,91	6,2	0,92	6,9	0,95
Ка, для Ca^{2+}	2,2	0,95	1,9	0,95	2,5	0,89
Ка, для кальмодуліну	1,2	0,94	1,3	0,95	1,3	0,98

г-коefficient регресії

Нами вивчений процес автофосфорилування КМ-кінази, що виділена в лімфоцитів селезінки щурів, яку, згідно з отриманими раніше і описаними нами результатами, ми відносимо до ферментів типу II. Встановлено, що автофосфорилування дійсно приводить до зменшення ферментативної активності, залежної від іонів Ca^{2+} і кальмодулі-

ну; Ca^{2+} -незалежна активність при цьому значно зростає, що повністю узгоджується з запропонованою різними авторами (McNeill, 1995, Ikeda, 1991) регуляторною моделлю описуваного процесу (рис. 4).

Дослідження впливу рентгенівського опромінення на даний механізм регуляції ферментативної активності КМ-кіназ показало, що автофосфорилування КМ-кінази під впливом радіації інтенсифікується. Активність фермента при цьому знижується, а співвідношення Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної форм зберігається (рис. 3).

Таким чином, на основі отриманих результатів можна стверджувати, що регуляторні процеси, описані для КМ-кіназ в інших клітин (Sato, 1990, Wenham, 1994) властиві ферменту, виділеному нами з лімфоцитів селезінки. Інтенсивність перебігу цих процесів та їх особливості дають нам ще більше підстав для того, щоб віднести виділений нами фермент до КМ-кіназ II типу. Крім того, процес автофосфорилування є радіочутливим, що суттєво відбивається на функціонуванні системи КМ-залежного фосфорилування і може бути причиною порушення протеїнкіназної активності в лімфоцитах селезінки виявленого нами раніше.

Встановлені нами зміни параметрів і компонентів системи cAMP і cGMP можуть бути доказом радіаційного порушення даних систем і, головне, свідчити про те, що адійснювана ними обробка і передача сигналу всередину клітини відбувається спотворено. Аномальні передачі сигналів обумовлюють, в свою чергу, порушення метаболічних процесів, які підконтрольні циклічним нуклеотидам. Найбільш важливими з цих регуляторних процесів є залежні від cAMP і cGMP системи фосфорилування (Соболев, 1987).

Нами було виявлено cAMP-залежну протеїнкіназу із цитозолу лімфоцитів селезінки щурів в контролі і після опромінення в дозі

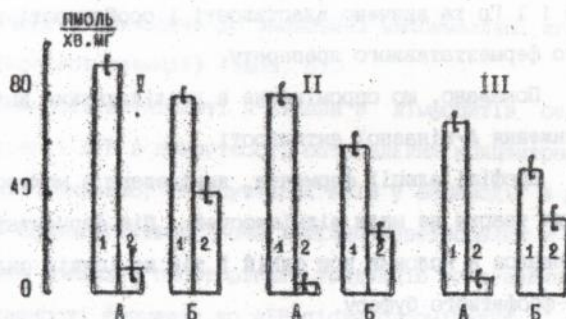


Рис. 3. Автофосфорилування КМ-кінази з лімфоцитів селезінки щурів: 1- загально активність, 2- активність незалежно від Ca^{2+} , А- неавтофосфорильована форма фермента, Б- автофосфорильована; I- контроль, II- опромінення в дозі 0,5 Гр, III- в дозі 1,0 Гр.

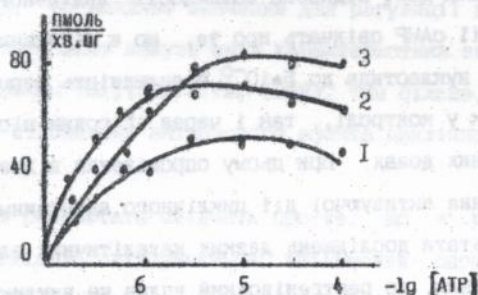


Рис. 4. Залежність автофосфорилування КМ-кінази з лімфоцитів селезінки щурів від концентрації АТФ:

- 1 - контроль
- 2 - опромінення в дозі 0,5 Гр
- 3 - опромінення в дозі 1,0 Гр.

0,5 і 1 Гр та вивчено властивості і особливості регуляції виділеного ферментативного препарату.

Показано, що опромінення в досліджуваних дозах приводило до пониження А-кіназної активності.

Профілі елюції фермента, виділеного з контрольних та опромінених тварин не мали відмінностей. Пік ферментативного препарату елюювався з колонки при одній і тій же іонній силі 0,2-0,3 М калій-фосфатного буферу.

Опромінення не викликало яких-небудь суттєвих змін у фізичних параметрах та у макроструктурі досліджуваного білка у розчині.

Експериментально доведено, що для активації досліджуваних протеїнкіназ необхідні різні концентрації cAMP (Северин, 1985). Отримані нами дані відносно залежності виділеного фермента від концентрації cAMP свідчать про те, що з підвищенням концентрації циклічного нуклеотида до $5 \cdot 10^{-6}$ М активність фермента максимально зростала як у контролі, так і через 12 годин після опромінення в досліджуваних дозах. При цьому опромінення в дозі 1 Гр приводило до збільшення активуючої дії циклічного аденозинмонофосфату.

Результати досліджень деяких каталітичних властивостей фермента показали, що рентгенівський вплив не викликав змін у залежності активності ферментів від концентрації іонів водню.

Не змінювалась температурна залежність фосфотрансферазної реакції (енергія активації при цьому становила: для контролю - 0,99; опромінення у дозі 0,5 Гр - 1,12; 1 Гр - 1,13 кДж/моль).

Для досліджуваного фермента кращим субстратом був гістон H2B. Опромінення приводило до суттєвих порушень у взаємодії фермента з даним субстратом (Км при опроміненні збільшується, що свідчить про зменшення спорідненості фермента до даного субстра-

ту, а це, в свою чергу, приводить до зменшення максимальної швидкості фосфотрансферазної реакції) (табл. 5).

Вивчення залежності активності А-кінази в лімфоцитах селезінки від концентрації АТФ в присутності оптимальних концентрацій білкового субстрата показало, що суттєвих змін у взаємодії з даним субстратом не спостерігається. Хоча лінійне перетворення у координатах Скетчарда дозволяє спостерігати тенденцію до незначного збільшення спорідненості фермента до АТФ після опромінення.

Уражуючи для рентгенівського опромінення на cAMP-залежні протеїнкінази також може бути локалізована на рівні механізмів регуляції їх активності. У зв'язку з цим ми провели дослідження функціонування ряду механізмів регуляції cAMP-залежних протеїнкіназ в умовах променевого ураження.

Ми припустили, що важливе значення для регуляції активності cAMP-залежних протеїнкіназ можуть мати характеристики зв'язування cAMP з протеїнкіназами (Nijayaaraiya, 1982), тим більше, що опромінення викликало підсилення активуючого ефекта циклічного нуклеотида на фермент.

Отримані нами результати свідчать про те, що в результаті дії іонізуючої радіації відбувається збільшення спорідненості фермента до cAMP. Ефект носить дозозалежний характер.

Ми встановили, що на ранніх етапах дії іонізуючої радіації в дозах 0,5 і 1 Гр відбувається порушення у взаємодії cAMP-залежних протеїнкіназ з cAMP, що, в свою чергу, може привести до суттєвих змін у функціонуванні фермента. Цей факт може обумовити виявлені раніше порушення в активації фермента з боку циклічного аденозинмонофосфату.

Специфічним для другої форми А-кіназ є автофосфорилування холоферментів (Toner-Webb, 1992). Оцінюючи радіочутливість авто-

фосфорилювання cAMP-залежних протеїнкіназ ми прийшли до висновку, що опромінення суттєво не впливає на сам процес автофосфорилювання.

Таблиця 5.

Кінетичні характеристики А-кінази в лімфоцитах селезінки щурів контрольних та опромінених щурів ($M \pm m$; $n=3-5$).

Значення показників	Контроль	Опромінення	
		0,5 Гр	1 Гр
Ка для cAMP, мкМ	$0,92 \pm 0,03$	$1,58 \pm 0,05^*$	$0,67 \pm 0,03$
Км для гістону, мг/мл	$0,28 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,20^*$	$0,59 \pm 0,04^*$
Км для АТР, мкМ	$71,9 \pm 8,5$	$37,2 \pm 4,8^*$	$55,4 \pm 6,3^*$
Кд для cAMP, мкМ	$32,8 \pm 2,5$	$29,1 \pm 0,8$	$13,5 \pm 5,5^*$

$P^* < 0,05$, в порівнянні з контролем.

Враховуючи важливість процесу автофосфорилювання для регуляції активності протеїнкіназ типу II, ми зробили спробу дослідження спільного впливу автофосфорилювання і cAMP на регуляцію активності cAMP-залежних протеїнкіназ лімфоцитів щурів в умовах променевого ураження.

Автофосфорилювання А-кінази у контролі привело до збільшення спорідненості холофермента до cAMP, про що свідчить зменшення більш ніж у два рази уявної Ка. При опроміненні цей процес носить діаметрально протилежний характер. Зі збільшенням дози спорідне-

ність автофосфорильованого холофермента до активатора різко знижується: після опромінення в дозі 0,5 Гр - у 1,5 рази; 1 Гр - в 3 рази (рис. 5).

Отримані результати вказують на радіочутливість процесу активації фосфотрансферазної реакції циклічним аденозинмонофосфатом. Не виключено, що чутливим до дії іонізуючого випромінювання може виявитись процес взаємодії cAMP з протеїнкіназами після їх автофосфорильовання (рис. 5).

При перезірці залежності цього ефекту від можливих порушень у зв'язуванні циклічного нуклеотида з фосфо- і дефосфотформами холофермента cAMP-залежних протеїнкіназ в умовах реакції автофосфорильовання ми встановили, що автофосфорильовання холофермента приводить до підсилення процесу зв'язування cAMP (Кд при цьому зменшується більш ніж у 4,5 рази). Опромінення не має суттєвого впливу на процес зв'язування cAMP неавтофосфорильованими формами і приводить до зниження зв'язуючої здатності автофосфорильованої форми (рис. 5).

Для перевірки припущення про ймовірність зміни механізмів автофосфорильовання А-кіназ в умовах променевого ураження нами була вивчена залежність інтенсивності автофосфорильовання від концентрації cAMP.

Наші дані свідчать про гальмуючу дію cAMP на процес автофосфорильовання cAMP-залежних протеїнкіназ у контролі. Для фермента, виділеного з лімфоцитів селезінки через 12 годин після опромінення в дозі 1 Гр, відмічена тенденція до зниження чутливості автофосфорильовання по відношенню до інгібуючої дії cAMP.

Таким чином, наші дослідження дозволяють стверджувати, що у ході фосфотрансферазної реакції нам вдалося зареєструвати різницю між фосфо- та дефосфотформами холофермента з лімфоцитів селезінки

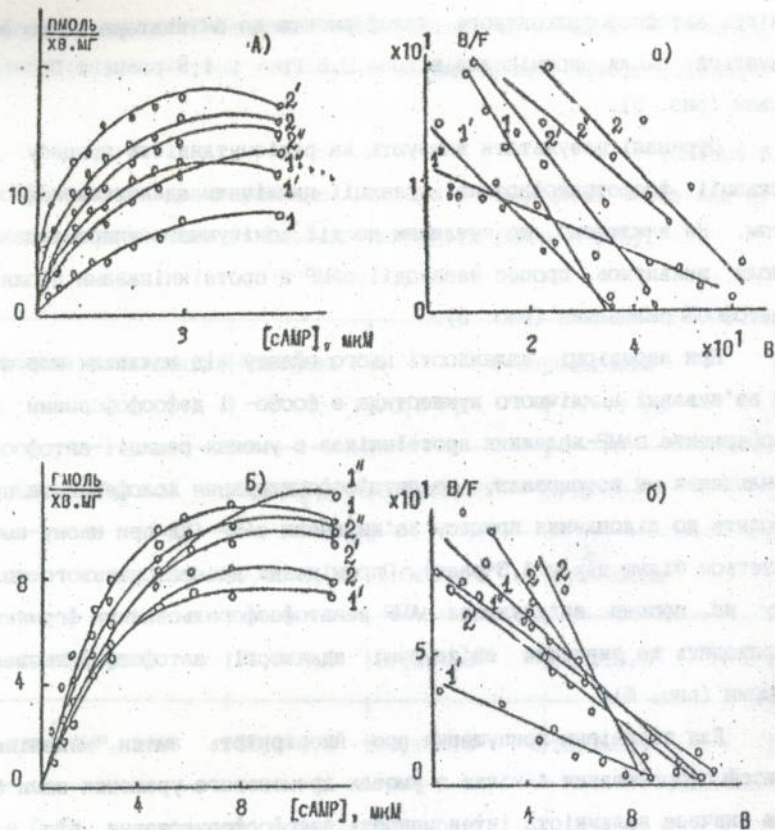


Рис. 5. Вплив автофосфорилування на залежність фосфотрансферазної реакції від концентрації сАМР (А, а) та на зв'язування ^3H -сАМР з холоферментом А-кінази (Б, б) в контролі (1, 2), після опромінення тварин в дозі 0,5 Гр (1', 2') та 1 Гр (1'', 2''):

1 - фосфоформа холофермента, 2 - дефосфоформа холофермента

як контрольних, так і опромінених тварин.

Проведені нами дослідження впливу рентгенівського опромінення на активність cAMP-залежних протеїнкіназ та особливості їх функціонування в лімфоцитах селезінки щурів уможливають висновок про радіочутливість вказаного метаболічного процесу.

Оскільки нами встановлені пострадіаційні порушення в системах циклічних нуклестидів лімфоцитів селезінки (Кучеренко, 1992), з одного боку, і в системі cAMP-залежного фосфорилування, з іншого боку, то виникла природна цікавість до вивчення G-кінази.

Ферментативний препарат cGMP-залежної протеїнкінази із лімфоцитів селезінки був отриманий шляхом елюції розчинної фракції з колонки з DEAE - целюлозою, з наступною гел'фільтрацією на сефадеколі G-200. Після хроматографії було отримано три піки: перші два піки характеризувалися слабкою стимуляцією протеїнкіназної активності з боку як cAMP, так і cGMP. Третій пік елювався при концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, яка становила 60 мМ і був найбільш вираженим в присутності cGMP і практично не активувався cAMP (в оптимальних умовах протікання реакції для A-кінази). Після гел'фільтрації нами отриманий виражений пік G-кіназної активності, який характеризувався високою зв'язуючою здатністю по відношенню до циклічного гуанозинмонофосфату.

Умови отримання ферментативних препаратів G-кіназ з лімфоцитів селезінки щурів після опромінення у дозах 0,5 і 1 Гр практично не відрізнялись від контрольних. Згідно отриманим даним після опромінення знижувалась активуюча здатність cGMP на всіх етапах очистки фермента, з підвищенням дози цей ефект посилювався, що могло обумовити зниження G-кіназної активності.

На чутливість виділеного ферментативного препарата до дії радіації вказують результати по вивченню гідродинамічних розмірів

часточок білкового препарату. Після опромінення відбувається перерозподіл часточок за розмірами: збільшувалась кількість часточок з великими гідродинамічними розмірами, що може побічно вказувати на можливі конформаційні перебудови в білковому препараті (Лебедев, 1987).

Дослідження інших властивостей виділеного фермента показало, що активність G-кінази в присутності cGMP підвищується, в присутності cAMP знижується, у відсутності циклічних нуклеотидів активність зовсім не визначалась.

В результаті вивчення залежності активності G-кінази в лімфоїдних клітинах селезінки щурів від концентрації іонів водню в різних буферних системах встановлено, що pH-оптимум для даного фермента знаходився в інтервалі 7,5-8. Рентгенівське опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр не викликало змін залежності активності фермента від концентрації іонів водню. Оптимум pH при дослідженні в різних буферних системах (трис-HCl буфері і K^+ -фосфатному буфері) зберігався в вищезгаданій області.

Вивчення впливу іонізуючої радіації на активацію фермента циклічним гуанозинмонофосфатом дозволило встановити пострадіаційне пригнічення цього процесу: з підвищенням дози опромінення ефект підсилювався. Мабуть, після опромінення тварин з досліджуваних доз відбуваються порушення в механізмах взаємодії фермента з циклічним нуклеотидом, що приводить до зниження ферментативної активності (табл. 6).

Результати по вивченню особливостей взаємодії G-кінази з АТР і білковим субстратом показали, що оптимальні умови фосфотрансферазної реакції, яка каталізується G-кіназою, для гістона і АТР відрізнялись від подібних для A-кінази. Криві залежності досягали свого насичення при концентраціях цих субстратів $\approx$ в 4,5 рази

менших, ніж у випадку з cAMP-залежним ферментом.

Таблиця 6.

Кінетичні характеристики взаємодії G-кінази з лімфоцитів селезінки в гістонам та АТР ($M \pm m$; $n=3-5$).

Значення показників	Стан		
	Контроль	0,5 Гр	1 Гр
Км для гістону, мг/мл	$0,35 \pm 0,15$	$0,30 \pm 0,20$	$0,25 \pm 0,10$
Км для АТР, мМ	$10,0 \pm 0,20$	$18,5 \pm 0,10^*$	$12,9 \pm 0,25^*$

* $p < 0,05$, в порівнянні з контролем.

Після опромінення в досліджуваних дозах відбувається пониження зв'язуючої здатності фермента до АТР (табл. 6).

Для спеціального дослідження реакції автофосфорилування cGMP-залежної протеїнкінази з лімфоцитів селезінки щурів був отриманий препарат фермента, який містив у собі невеликі кількості циклічних нуклеотидів (Faster, 1981). Процес автофосфорилування в цьому препараті протікав дуже повільно і малою мірою. Мабуть, більш низький ефект стимулювання процесу cGMP можна пояснити більш високим вмістом даного циклічного нуклеотиду в отриманому нами ферментативному препараті (Nakasawa, 1975).

Нами встановлено, що процес автофосфорилування порушується після дії іонізуючої радіації: Км в контролі складала $120,0 \text{ мМ} \pm 2,1$, після опромінення в дозі 0,5 Гр - $50,0 \text{ мМ} \pm 7,0 \text{ мМ}$, в

дові 1 Гр - $19,7 \pm 2,1$ мкМ. Спорідненість G-кінази до АТР після опромінення різко зростає, що приводить, вірогідно, до інтенсифікації процесу автофосфорильовання холофермента.

Вивчення особливостей фосфотрансферазної реакції, яка каталізується фосфо- і дефосфотформами cGMP-залежної протеїнкінази показало, що автофосфорильовання фермента не змінювало спорідненості останнього до cGMP, але при цьому майже в 2 рази знижувало каталітичну активність, що угаджується з літературними даними, які є по цьому питанню (Foster, 1987). Вплив іонізуючого випромінювання приводив до деякого зменшення взаємодії фосфофермента з основним активатором фосфотрансферазної реакції в GMP (рис. 6).

Треба відзначити також тенденцію до зниження спорідненості автофосфорильованого фермента до cGMP, яка властива G-кіназі після опромінення як у дозі 0,5 Гр, так і 1 Гр. Отриманий результат дає можливість припустити, що причиною встановленого раніше зниження G-кіназної активності в лімфоцитах селезінки після опромінення може бути рівна ступінь фосфорильованості холофермента, яка неминуче приведе до порушення активації фермента з боку cGMP.

При дослідженні впливу cAMP на процес автофосфорильовання отримані результати, які свідчать, що цей процес залежить від cAMP і цей циклічний нуклеотид бере участь у регуляції активності G-кінази. Міра впливу cAMP на процес автофосфорильовання, зокрема, і на регуляцію активності взагалі, після опромінення зменшується. Причому ступінь цього зменшення зростає зі збільшенням дози опромінення.

Таким чином, нами в розчинній фракції лімфоцитів отримана cGMP-залежна протеїнкіназа, яка характеризується високою спорідненістю до cGMP і активність якої регулюється також і cAMP.

Рентгенівське опромінення в дозах 0,5 і 1 Гр порушує нор-

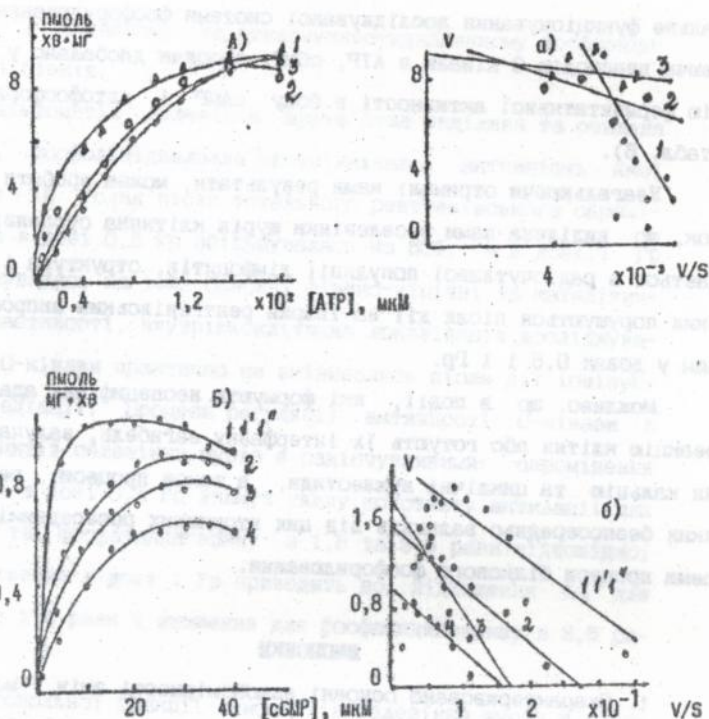


Рис. 6. Залежність автофосфорилування С-кінази з лімфоцитів селезінки щурів від концентрації АТР (А, а) та вплив автофосфорилування на швидкість фосфотрансферазної реакції (Б, б): 1- контроль, 2- опромінення в дозі 0,5 Гр, 3- в дозі 1,0 Гр; 1, 1', 1'' - дефосфорформа С-кінази, 2- фосфорформа в контролі, 3- фосфорформа після опромінення в дозі 0,5 Гр, 4- фосфорформа після опромінення в дозі 1,0 Гр.

мальне функціонування досліджуваної системи фосфорилування, модулюючи взаємодію G-кінази з АТР, cGMP, зносячи дисбаланс у регуляцію ферментативної активності з боку cAMP і автофосфорилування (табл. 6).

Узагальнюючи отримані нами результати, можна зробити висновок, що виділена нами в селезінки щурів клітинна суспензія складається з радіочутливої популяції лімфоцитів, структура і функції яких порушуються після дії на тварин рентгеновським випромінюванням у дозах 0,5 і 1 Гр.

Можливо, що в події, які формують неспецифічну адаптаційну реакцію клітин або готують їх інтерфази загибель, залучаються іони кальцію та циклічні нуклеотиди, а також процеси, реалізація яких безпосередньо залежить від цих вторинних посередників: зокрема процеси білкового фосфорилування.

ВИСНОВКИ

1. Охарактеризовано основні закономірності змін морфофункціонального стану лімфоцитів селезінки щурів після гострого опромінювання тварин в дозах 0,5 та 1 Гр, ці зміни у вивченому діапазоні доз цілком зворотні і в проявом неспецифічної клітинної стрес-реакції.
2. Іонізуюча радіація в дозах 0,5 та 1 Гр викликає дисфункцію аденілатциклазної та гуанілатциклазної систем, модулюючи активність ферментів, які контролюють внутрішньоклітинну концентрацію циклічних нуклеотидів.
3. Вивчено внесок різних систем фосфорилування в рівень загальної протеїнкіназної активності лімфоїдних клітин селезінки та тимусу щурів. Встановлено, що опромінення в досліджуваному діапазоні доз викликає якісно різні зміни

в Ca^{2+} , залежному та циклонуклеотидзалежному фосфорилуванні білків.

4. Із лімфоцитів селезінки щурів була виділена та очищена Ca^{2+} , фосфоліпідзалежна протеїнкіназа, активність якої через 12 годин після тотального рентгенівського опромінення в дозі 0,5 Гр збільшувалась на 50%, а в дозі 1 Гр зменшувалась на 14%. Основні фізико-хімічні та каталітичні властивості, внутрішньоклітинна локалізація досліджуваної С-кінази практично не змінювались після дії іонізуючої радіації. Процеси регуляції активності С-кінази в лімфоцитів селезінки щурів є радіочутливими: опромінення тварин в дозі 0,5 Гр знижує уявну константу активації для Ca^{2+} та фосфатидилсерину в 1,6 та 3,5 рази відповідно; опромінення в дозі 1 Гр приводить до підвищення K_m для Ca^{2+} в 1,6 рази і зниження для фосфатидилсерину в 2,5 рази.

5. З цитозольної фракції лімфоцитів селезінки щурів в контролі та через 12 годин після дії іонізуючого опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр виділена Ca^{2+} , кальмодулінзалежна протеїнкіназа. Вивчено субстратну специфічність, особливості взаємодії з АТР, різними білковими субстратами, іонами Mg^{2+} , Ca^{2+} та кальмодуліном, що дозволило віднести отриману КМ-протеїнкіназу до типу II. Автофосфорилування холоферменту приводило до зниження каталітичної активності.

6. Рентгенівське опромінення в досліджуваних дозах не впливало на фізико-хімічні, каталітичні властивості та особливості взаємодії КМ-кінази з Ca^{2+} та кальмодуліном. Встановлено, що процес автофосфорилування є радіочутли-

- вим; з підвищенням дози опромінення він інтенсифікується.
7. Із лімфоцитів селезінки щурів була виділена cAMP-залежна протеїнкіназа, активність якої через 12 годин 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 cAMP-залежної протеїнкінази лімфоцитів не змінювались, при цьому знижувалась спорідненість до білкового субстрату - гістону H2B та збільшувалась спорідненість до основного активатора ферментативної активності - cAMP.
8. Отриманий з лімфоцитів селезінки препарат cAMP-залежної протеїнкінази мав здатність брати участь у реакції автофосфорилювання. Опромінення не впливало суттєво на цей процес, але приводило до зниження зв'язуючої здатності холоферменту до cAMP (після опромінення в дозі 0,5 Гр - в 2 рази, в дозі 1 Гр - в 3 рази).
9. З лімфоцитів селезінки щурів послідовно методом колонкової хроматографії та гель-фільтрацією був виділений препарат cGMP-залежної протеїнкінази, активність якої статистично значимо зменшувалась після дії рентгенівського випромінювання в дозі 0,5 і 1 Гр, що пов'язано, вірогідно, з установленим пострадіаційним зниженням зв'язуючої здатності ферменту по відношенню до cGMP.
10. Визначені оптимальні умови проведення фосфотрансферазної реакції, яка каталізована G-кіназою, в контролі і після опромінення. Встановлено суттєве пострадіаційне зниження зв'язуючої здатності фермента по відношенню до ATP та іонів магнію.
11. Встановлено, що виділений з лімфоцитів препарат G-кінази

здатний до автофосфорилування, яке приводить до значного (більш ніж у 2 рази) зниження каталітичної активності. Опромінення не впливало на процес автофосфорилування, але викликало зменшення спорідненості автофосфорильованого фермента до cGMP.

12. Виділена з селєвінки щурів клітинна суспензія являє собою радіочутливу популяцію лімфоцитів, структура яких порушується після дії на тварин рентгенівським опроміненням у дозах 0,5 і 1 Гр. Молекулярними механізмами реалізації дії опромінення на клітини через систему вторинних посередників (Ca^{2+} , cAMP, cGMP) є зміни активності Ca^{2+} і циклонуклеотидзалежних систем білкового фосфорилування. Пострадіаційні порушення в функціонуванні цих систем можна розглядати як складову загальної неспецифічної адаптаційної реакції клітинної системи у відповідь на дію випромінювання.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Остапченко Л.И., Протас А.Ф., Васильев А.Н., Кучеренко Н.Е. Выделение и некоторые свойства Ca^{2+} , фосфолипидазависимой протеинкиназы серого вещества головного мозга крысы на раннем этапе воздействия ионизирующей радиации // Радиобиология. - 1986. - т. 26, N 6. - С.761-765.
2. Остапченко Л.И., Васильев А.Н., Кучеренко Н.Е. Кинетические характеристики Ca^{2+} , фосфолипидазависимых протеинкиназ // ДАН УССР. - 1986. - N 10. - С.48-61.
3. Остапченко Л.И., Васильев А.Н., Кучеренко Н.Е. Влияние автофосфорилирования на связывание циклического аденозинмонофосфата cAMP-зависимыми протеинкиназами головного мозга крысы после рентгеновского облучения // Радиобиоло-

- гия. - 1987. - т. 27, N 5. - С.633-636.
4. Остапченко Л.И., Васильев А.Н., Кучеренко Н.Е. Связывание циклического аденозинмонофосфата cAMP-зависимыми протеинкиназами мозга в начальный период острого лучевого воздействия // Радиобиология. - 1987. - т. 27, N 5. - С.630-633.
 5. Остапченко Л.И., Васильев А.Н., Кучеренко Н.Е. Регуляция активности Ca^{2+} , фосфолипидзависимых протеинкиназ головного мозга крыс в условиях острого лучевого поражения // Радиобиология. - 1988. - т. 28, N 4. - С.464-467.
 6. Слатвинська О.А., Ручко М.В., Остапченко Л.І., Кучеренко М.Є. Вміст циклічних нуклеотидів у лімфоїдних клітинах щурів в умовах опромінювання в різних дозах іонізуючого випромінювання // Доп. АН України. - 1990. - N 12. - С.59-62.
 7. Кучеренко Н.Е., Матышевская О.П., Остапченко Л.И. и др. Содержание циклических нуклеотидов, свободного цитоплазматического Ca^{2+} и малонового диальдегида в лимфоцитах и тимocyтах крыс при действии невысоких доз радиации // Радиобиология. - 1991. - т. 31, N 5. - С.739-742.
 8. Остапченко Л.І., Ручко М.В., Кучеренко М.Є. c/MP-залежне фосфорилування комплексів гістонів // Вісник КУ. - 1991. - N 3. - С.28-31.
 9. Остапченко Л.І., Ручко М.В., Кучеренко М.Є. Кінетичні характеристики Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінази лімфоцитів опромінених щурів // Вісник КУ. - 1992. - N 6. - С.36-39.
 10. Остапченко Л.І., Ручко М.В., Кучеренко М.Є. Активация протеїнкіназы С в лимфоцитах селезенки контрольных та оп-

роміненні шурів при стимуляції їх мітогенами // Вісник КУ. - 1993. - т. 25. - С.3-5.

11. Нальовіна О.Є., Остапченко Л.І., Кучеренко М.Є. Вплив іонізуючого опромінення на морфофункціональний стан клітин імункомпетентних органів шурів // Вісник КУ. - 1993. - т. 25. - С.5-10.

12. Налєвіна О.Є., Остапченко Л.І., Кучеренко Н.Є. Влияние ионизирующего облучения на морфофункциональное состояние иммунокомпетентных органов крыс // Радиобиол. съезд. Киев. - 1993. - ч. 2. - С.704-705.

13. Позур В.К., Матышевская О.П., Остапченко Л.І., Кучеренко Н.Є. Индукция бактериальными пептидогликаном и липосахаридом ранних и промежуточных признаков активации лимфоидных клеток экспериментальных животных // Иммунология. - 1993. - N 1. - С.25-28.

14. Кучеренко М.Є., Остапченко Л.І., Нальовіна О.І. Вивчення чутливості циклонуклеотидзалежних протеїніназ до дії патогенних факторів // Доп. АН України. - 1994. - N 10. - С.133-134.

15. Остапченко Л.І., Налєвіна О.Є., Пархомец Т.І. Пострадиационные нарушения в системе циклических нуклеотидов лимфоцитов селезенки и тимуса крыс // Укр. биох. журн. - 1994. - т. 87. - С.70-75.

16. Ручко М.В., Остапченко Л.І., Налєвіна О.Є., Кучеренко Н.Є. Влияние различных доз ионизирующего излучения на функциональную активность и механизмы активации лимфоидных клеток селезенки и тимуса крыс при воздействии стимулирующего сигнала // Рад. биология. Радиэкология. - 1994. - т. 34, N 2. - С.247-250.

17. Остапченко Л.І., Долішняк О.І., Кучеренко М.Є. Вплив рентгенівського опромінення на рівень активності та субклітинний розподіл циклонуклеотидазалежних та Ca^{2+} , фосфоліпідазалежних протеїніназ // Вісник КУ. - 1995. - т. 26. - С.139-146.
18. Остапченко Л.И. Ca^{2+} , фосфолипидазависимые протеинкиназы и их роль в регуляции некоторых метаболических процессов // Укр. биох. журн. - 1995. - т. 87, N 6. - С.3-11.
19. Остапченко Л.И. Действие ионизирующей радиации на функциональную активность лимфоидных клеток // Укр. биох. журн. - 1996. - т. 88, N 4. - С.55-64.
20. Остапченко Л.І. Особливості активації cGMP-залежних протеїніназ із лимфоцитів селезінки щурів за умов опромінення // Укр. біохім. журн. - 1996. - т. 68, N 6. - С.33-37.
21. Остапченко Л.И. Роль автофосфорилирования в регуляции активности cAMP-зависимых протеинкиназ из лимфоцитов селезенки крыс в условиях воздействия ионизирующей радиации // Укр. биохим. журн. - 1997. - т. 69, N 1. - С.70-74.
22. Остапченко Л.И. Влияние рентгеновского облучения на характеристики и основные свойства Ca^{2+} , кальмодулиназависимой протеинкиназы из лимфоцитов селезенки крыс // Укр. биохим. журн. - 1997. - т. 69, N 3 - С.57-61.
23. Ostapchenko L., Nalevina O., Dolishnyak O. The effect of low dose radiation on the mitogen-driven proliferation on spleenes lymphocytes // Int. conf. Radiation and Health. Beer Sheva. Israel. - 1996. - P.216.
24. Остапченко Л.И., Ручко М.В., Кучеренко Н.Е. Нарушения в

системах фосфорилирования лимфоидных клеток тимуса и селезенки при облучении // Иммунный статус человека и радиация. Межд. научн. конф. Гомель. - 1991. - С.50.

25. Остапченко Л.И., Ручко М.В., Кучеренко Н.Е. Пострадиационные нарушения в системах Ca^{2+} , фосфолипидзависимого фосфорилирования лимфоидных клеток селезенки крыс // 7 Межд. конф. по спектроскопии биополимеров. Харьков. - 1991. - С.182-183.

26. Нальовина О.Б., Остапченко Л.И., Кучеренко М.Б. Вплив іонізуючого опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр на деякі показники кровотворення та імунітету // Міжн. наук. конф. "Навколишнє середовище і здоров'я". Чернівці. - 1993. - С.118.

27. Остапченко Л.И., Нальовина О.Б., Пархоменко Т.И. Вплив іонізуючого опромінення в дозах 0,5 та 1 Гр на функціональну активність компонентів циклонуклеотидзалежних систем регуляції метаболізму щурів // 1 в'їзд Укр. біофіз. товариств. Київ. - 1994. - Тез. допов. - С.179-180.

Остапченко Л.И. "Молекулярные механизмы функционирования систем белкового фосфорилирования в лимфоцитах селезенки крыс в условиях радиационного воздействия". Диссертация на соискание научной степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Киевский университет им. Тараса Шевченко, Киев, 1997.

Защищается диссертация, по материалам которой опубликовано 27 научных работ, содержащих результаты исследований особенностей функционирования циклонуклеотидзависимых и кальцийзависимых систем белкового фосфорилирования в лимфоцитах селезенки крыс. Уста-

новлено, что активность Ca^{2+} , фосфолипидазависимой протеинкиназы намного превышала активность cAMP-, cGMP- и Ca^{2+} , кальмодулиназависимых ферментов. Облучение животных рентгеновскими лучами в дозе 0,5 и 1 Гр приводило к существенным нарушениям в молекулярных механизмах регуляции активности исследуемых протеинкиназ. Установлена множественная радиопоражаемость системы Ca^{2+} , фосфолипидазависимого фосфорилирования, что позволяет предположить участие именно этой системы в формировании неспецифической адаптационной реакции лимфоцитов в ответ на действие радиации.

Ostapchenko L.I. "Molecular mechanisms of protein phosphorylation systems functioning in rat's lymphocytes with influence of X-ray irradiation".

Dissertation for the obtaining of the scientific degree of the Doctor of Science specialized in 03.00.04 - Biochemistry, Taras Shevchenko University. Kyiv, 1997.

In twenty seven scientific works having been spoken in support of. We can find information about influence X-ray irradiation upon the functioning of cyclic nucleotid-dependent and Ca^{2+} -dependent systems of protein phosphorylation in rat's spleen lymphocytes. It was shown, that Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase activity was much more higher than cAMP-, cGMP- and Ca^{2+} , calmodulin-dependent enzymes activity: X-radiation influence in doses 0,5 and 1 Gr resulted in essential infringements in molecular mechanisms of regulation activity of researched protein kinases. X-radiation defeat of Ca^{2+} , phospholipid-dependent phosphorylation system was found. It allows to suppose participation of C-kinase in forming

nonspecified adaptation lymphocytes reaction to the X-radiation effect.

Ключові слова: лімфоцити, сАМР-залежна протеїнкіназа, сGMP-залежна протеїнкіназа, Ca^{2+} , фосфоліпідзалежна протеїнкіназа, Ca^{2+} , кальмодулінзалежна протеїнкіназа, автофосфорилування, рентгенівське опромінення.

ссу-

AB 38.174