

УДК 577.346 + 577.15

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЕРИТРОЦИТІВ І КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

Я. Верніковська, Т. Виговська, Л. Старикович, Г. Бесеріль Арагон,
Г. Клевета

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна,
e-mail: kfbh@franko.lviv.ua.*

З'ясовано активацію ферментів антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази в еритроцитах, еритроїдній та міелоїдній популяціях кісткового мозку щурів за умов щодобового іонізуючого опромінення дозою $0,258 \text{ мС} \cdot \text{кг}^{-1}$ упродовж 30 днів. Доведено зменшення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроїдній та міелоїдній популяціях кісткового мозку в термінальні терміни опромінення. Зафіксовано, що характер змін активності названих ферментів залежить від ступеня зрілості клітин і виявляється різною мірою залежно від терміну опромінення.

Ключові слова: іонізуюче випромінювання, еритрон, ферменти антиоксидантної системи.

Активация перекисного окиснения липидов у цільній крові, печінці та в імуні-компетентних клітинах виявлена за умов дії різних факторів, зокрема іонізуючого випромінювання; водночас простежується зростання активності ферментів антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) та глутатіонредуктази (ГР) [1, 2]. Однак механізм реакції-відповіді в клітинах еритро-ну та клітинах-попередниках білого ряду не досліджений.

За умов іонізуючого опромінення зростає вірогідність утворення одноелектронної відновленої форми молекулярного кисню (супероксидного радикала) та його похідного – синглетного кисню. Наказава та співавтори [13] ще 1980 р. з'ясували, що, очевидно, головними агентами, які уражують головки фосфоліпідів мембран за умов радіаційного стресу, є H^{\cdot} , OH^{\cdot} та супероксиданіон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Це може спричинити низку ушкоджень у живій системі: окиснення залишків сульфгідрильних груп білків, порушення структури ДНК (пуринових і піримідинових

основ), а також окиснення ненасичених жирних кислот із утворенням різних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що спричиняє суттєве порушення мембранних структур і пов'язаних із ними комплексів [2].

Найліпше дослідженими елементами ферментативного захисту від реактивних метаболітів O^{2-} є СОД; ГПО та каталаза; ГПО та глутатіонтрансфераза (ГТФ); глутатіонтрансфераза. Крім того, до цієї системи включають гідратазу, хінонредуктазу, формальдегіддегідрогеназу, гліоксилазу та деякі інші ферменти [3].

Функціонування ГПО тісно пов'язане з ГР, що регенерує G-SH із GS-SG. Вони утворюють єдину антипероксидну систему, що забезпечує глутатіоновий редокс-цикл. Функціонування ГР та ферментів, що лімітують швидкість пентозофосфатного шляху – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Гл-6-Ф-ДГ) та 6-фосфоглюконатдегідрогенази, в багатьох тканинах тісно взаємопов'язані [3]. Зазначено, що за умов активного функціонування ГПО рівень G-SH може суттєво зменшуватися внаслідок недостатності NADPH, забезпечується пентозофосфатним циклом. Це може призводити до порушення процесів мембранного транспортування, активації Ca^{2+} -залежних протеїназ і руйнування структури цитоскелета й клітини загалом [2].

Оскільки система еритроноу за умов хронічного рентгенівського опромінювання зазнає тривалого оксидативного стресу й представлена різними типами клітин (ядерними зі специфічними особливостями метаболізму й без'ядерними – еритроцитами), та метою наших досліджень було вивчення окремих ферментів антиоксидантного захисту за умов низькоінтенсивного хронічного опромінення в еритроцитах та еритроїдній і мієлоїдній популяціях кісткового мозку щурів.

Досліди проводили впродовж 30 діб на білих лабораторних щурах-самках з масою тіла 130–150 г. Тварин розділяли на дві групи. До першої групи належали інтактні (контрольні) тварини, до другої – тварини, яких упродовж 30 діб опромінювали на апараті РУМ-11 із використанням фільтрів Cu (0,5 мм) та Al (1 мм) щодобовою експозиційною дозою 0,258 мКл/кг; потужність дози – $0,001075 \text{ мКл} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; напруга 140 кВ, сила струму – 4 мА, шкірно-фокусна відстань 178 см.

Декапітацію тварин виконували під ефірним наркозом, гепаринізовану кров тричі промивали охолодженим фізіологічним розчином і центрифугували (600 г) в охолоджену стані. Кістковий мозок видаляли зі стегнових і гомілкових кісток шляхом аспірації і розділяли його клітини в системі фікол-тразограф за методикою [6]. Гемоліз еритроцитів і клітин кісткового мозку проводили дворазовим заморожуванням у рідкому азоті та наступним розморожуванням. Активність СОД визначали за Чеварі [8], ГПО – за Манном [4], ГР – за Бойтлером [5], Г-6-Ф-ДГ – за Бергмейером [5].

Дослідження активності ферментів антиоксидантної системи засвідчило, що активність СОД у кістковому мозку значно перевищує активність еритроцитарного ферменту, а активність ферменту білого ростка відповідає еритроїдній фракції (табл. 1, рис. 1).

Таблиця 1
Активність ферментів антиоксидантного захисту та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в нормі

Зразок	Ферменти			
	СОД, МО/хв×мг білка	ГПО <i>n</i> =11 нмоль/хв ×мг білка	ГР <i>n</i> =9 нмоль/хв× ×мг білка	Г-6-ФДГ <i>n</i> =8 нмоль/хв× ×мг білка
Цільна кров <i>n</i> =7	36,5 ± 14,7	—	—	—
Еритроци- ти <i>n</i> =12	52,6 ± 2,9	—	—	—
Мієлоїдни й ряд <i>n</i> =4	1902,0± 593,8	5,46 ± 0,43	5,49 ± 0,84	197 ± 24
Еритроїдн ий ряд <i>n</i> =6	1856 ± 282,4	4,59 ± 0,56	7,46 ± 0,45	173 ± 13

Аналогічна тенденція простежується і щодо ГПО та ГР.

За допомогою імунохімічних тестів та інших методів з'ясовано високу активність названих вище ферментів у еритроцитах, мозку, печінці та щитоподібній залозі, тобто в тканинах зі значним рівнем аеробного обміну [6].

Щодобове опромінення щурів дозою 0,258 мКл/кг призводить до змін в активності досліджуваних ферментів. Як у цільній крові, так і в еритроцитах зафіксовано зростання активності СОД на 10-ту добу експерименту, що корелює зі зростанням активності в різних ростках кісткового мозку. Виявлено, що у випадку одноразового опромінення високими дозами (до 200 Гр) СОД, як перехоплювач O_2^- була малоефективною, тобто пероксидація ліпідів була причиною радіаційної інактивації мембраноз'язаних ферментів, однак за менших доз її захисна функція є вірогідною [1, 3]. Справді, нашими дослідженнями з'ясовано, що за умов хронічного рентгенівського опромінення щодобовою дозою 0,258 мКл/кг активність СОД зростає, що свідчить про ефективне знешкодження супероксид-аніон радикала цим ферментом за умов радіаційного стресу. З'ясовано [7], що за дії радіації виникає індукція синтезу СОД у гемопоетичних клітинах кісткового мозку. Для ферменту, що бере участь у знешкодженні перекису водню та інших пероксидів – ГПО, є ха-

рактальною синхронна з СОД зміна активності на всі названі терміни й більша вираженість ефектів у клітинах білого ряду (рис. 1, б; 2). ГР має іншу динаміку змін. Наприклад, на 10-ту добу активність цього ферменту відповідає нормі, а на 20- і 30-ту – зростає (рис. 3). Причиною таких змін може бути посилене продукування НАДФН, що утворюється в глюкозо-6- фосфатдегідрогеназній реакції. Однак активність цього ензиму достовірно зростає тільки на 10-ту добу, а на наступні строки зменшується (рис. 4). Роземейер [14]

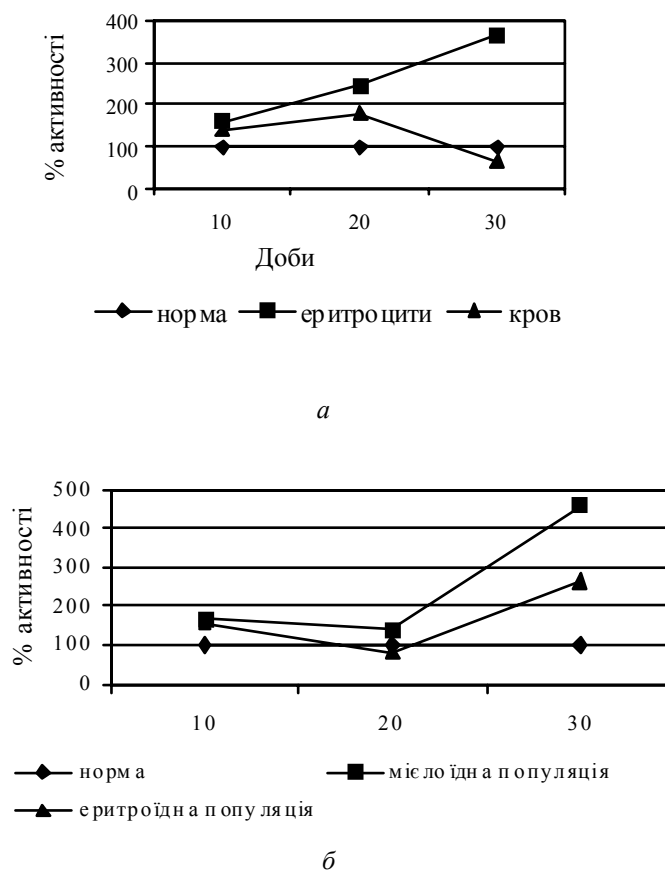


Рис. 1. Активність СОД у цільній крові, еритроцитах (а), а також в окремих клітинних популяціях кісткового мозку (б) щурів за умов хронічного рентгенівського опромінення щодобовою дозою 0,258 мКл/кг (норма прийнята за 100 %).

висловив гіпотезу про наявність єдиного мультиферментного неструктурного комп-

лексу, до складу якого входять ГР та дегідрогенази окиснювальної частини пегозофосфатного шляху. Раніше була доведена участь ГР в опосередкованій дії окисненого глутатіону на деінгібування Г-6-Ф-ДГ [12]. Можна припустити, що виявлена нами активація ГПО на фоні збереження активності ГР у нормі на 10-ту добу призводить до накопичення окисненого глутатіону в еритроїдних і мієлоїдних клітинах, що забезпечує функціонування Г-6-Ф-ДГ на досить високому рівні в цей термін. Зростання активності ГР на 20- та 30-ту доби за умов зниженої активності Г-6-Ф-ДГ можна пояснити надходженням НАДФН з інших джерел, наприклад із НАДФ-ізоцитратдегідрогеназної реакції, рівень активності якої в клітинах-попередниках кісткового мозку є значним.

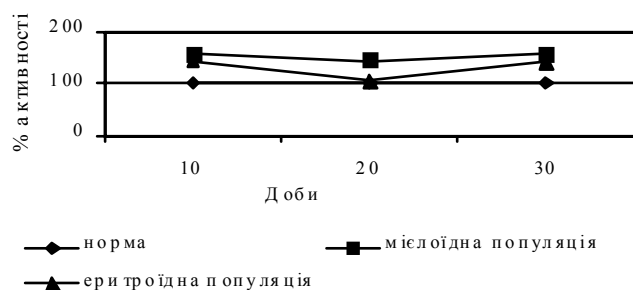


Рис. 2. Активність глутатіонпероксидази в процентах (норма прийнята за 100%) окремих клітинних популяцій кісткового мозку щурів за умов хронічного рентгенівського опромінення щодобовою дозою 0,258 мКл/кг.

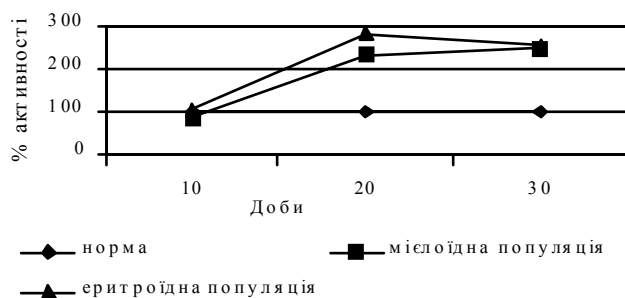


Рис. 3. Активність глутатіонредуктази у відсотка (норма прийнята за 100%) окремих клітинних популяцій кісткового мозку щурів за умов

хронічного рентгенівського опромінення щодобовою дозою 0,258 мКл/кг.

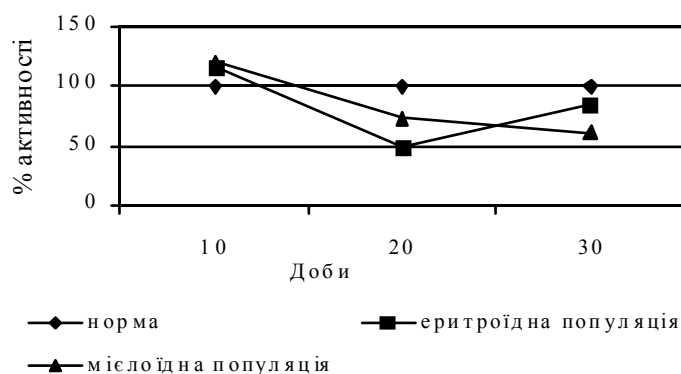


Рис. 4. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у відсотках (норма прийнята за 100 %) окремих клітинних популяцій кісткового мозку щурів за умов хронічного рентгенівського опромінення щодобовою дозою 0,258 мКл/кг.

Отже, відповідь окремих ферментів антиоксидантної системи на тривале рентгенівське опромінення низькими дозами є клітинспецифічною і в межах наших досліджень непрямо свідчить про високу ефективність захисту від продуктів, що посилено утворюються за умов радіаційного ураження: супероксид-аніон радикала, перекису водню, гідроперекисів тощо.

1. Барабой В. А., Олійник С. А., Хмелевський Ю. В. Стан антиоксидантної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності // Укр. біохім. журн. 1994. Т. 66. № 4. С. 3–18.
2. Коломійцева И. К. Радиационная биохимия мембранных липидов. М., 1989.
3. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи совр. биологии. 1993. Т. 113. Вып. 1. С. 107–121.
4. Манн В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 124.
5. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. Ленинград, 1982.
6. Сибирная Н. А., Сухомлинов Б. Ф., Хмель М. В. Метод фракционирования клеток костного мозга в градиенте фикол-верографин // Лаб. дело. 1991. № 4.

- С. 24–25.
7. Турков М. И. Супероксиддисмутаза : свойства и функции //Успехи совр. Биологии. 1976. Т. 81. Вып. 3. С. 341–354.
 8. Чевари С., Андял Т., Штиренгер Д. Определение антиоксидантных параметров крови и диагностическое значение в преклонном возрасте // Лаб. дело. 1991. № 10. С. 9–13.
 9. Garcia G., Noguera M., Freire M. Purification and characterization of a that controls the oxydative phase of the pentose phosphate cycle in liver and other tissues of rat // Biochim. and Biophys. acta. 1989. Vol. 990. N 1. P. 59–65.
 10. Chapmann R. C., Hennessey M. A., Waltersdorph A. M. Erythrocyte metabolism. Y. Level of glycolysis // J. Clin. Invest. 1962. Vol. 41. P 1249–1256.
 11. Kovarova H., Krisala M., Dostal M. Activity of superoxide dismutase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase // Cell. Biochem. and Funct. 1987. Vol. 5. N 1. P. 41–45.
 12. Llobel A., Lopez-Ruiz A., Peinado J. et al. Glutathione reductase directly mediates the stimulation of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by GS-SG // Biochem. J. 1988. Vol. 249. N 1. P. 293–296.
 13. Nakazava T., Nagatsuka S. Radiation-induced lipid peroxidation and membrane permeability in liposome // Intern. J. Radiat. Biol. 1980. Vol. 38. N 5. P. 537–544.
 14. Rosemeyer M. A. The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase // Cell. Biochem. and Funct. 1987. Vol. 5. N 1. P. 79–95.

STUDY OF ANTIOXIDANT SYSTEM ENZYMES ACTIVITY OF RATS ERYTHROCYTES AND OF BONE MARROW FOLLOWING LOW-LEVEL X-RAY IRRADIATION

Ya. Vernikovska, T. Vigovska, L. Starikovich, G. Becerril Aragon, G. Kleveta

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevskoho st., 4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: kfbh@franko.lviv.ua*

The activation of antioxidant system enzymes: superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase in erythrocytes, bone marrow erythroid and myeloid populations of rats following irradiation in 0.258 mCi / kg daily dose during 30 days has been found. The glucose-6-phosphate dehydrogenase activity decrease of bone marrow erythroid and myeloid populations in later terms of irradiation has been shown. It was pointed out, that the character of those enzymes activity changes depended on mature degree of cells and was observed in different kinds according as irradiation term.

Keywords: ionizing radiation , erythron, antioxidant system enzymes.

Стаття надійшла до редколегії 24.04.2001

Прийнята до друку 29.04.2001