

УДК 577.346:577.152.9:613.341

ДОСЛІДЖЕННЯ ОКРЕМИХ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОГО КИШКІВНИКА ЩУРІВ ЗА УМОВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

Г. Клевета, Я. Чайка, Л. Старикович, Т. Виговська

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

Досліджено активність основних ферментів антиоксидантного захисту: супероксидисмутази, каталази, глутатйонпероксидази та глутатйонредуктази в епітеліальних клітинах слизової оболонки тонкого кишківника щурів за умов щодобового йонізуючого опромінення дозою 0,01 Гр протягом 30 днів та після припинення впливу низькоінтенсивного рентгенівського опромінення.

Виявлено зміни в активності досліджуваних ферментів в разі хронічної дії рентгенівського випромінювання на всі терміни опромінення, а також після припинення дії радіації.

З'ясовано, що характер цих змін залежить від дози опромінення та часу, що минув від початку опромінення.

Ключові слова: йонізуюче випромінювання, малі дози, ентероцити, супероксидисмутаза, каталаза, глутатйонпероксидаза, глутатйонредуктаза.

Відомо, що біологічна дія малих доз йонізуючого випромінювання зумовлює певні зміни в організмі [1, 2, 4]. Сьогодні є багато даних про дію на макромолекули, клітини, організми великих доз йонізуючого випромінювання, однак немає ні достатньої кількості даних, ні теоретичних уявлень про вплив на біохімічні процеси в живому організмі техногенного підвищення радіаційного фону, наприклад у два-чотири рази.

Дослідження останніх років засвідчили, що залежність доза-ефект за малих доз опромінення є не лінійною, а складною бімодальною. Нелінійна бімодальна залежність ефекту від дози пояснюється тим, що існує розрив між дозами, які спричинюють пошкодження в біооб'єктах, і дозами, що ініціюють системи їхнього відновлення. Тому доки система відновлення (адаптації) не працює із повною ефективністю, тобто за умов неповномасштабного задіяння системи адаптивної репарації, ефект дії низько інтенсивного опромінення посилюється зі зменшенням дози, потім може зменшуватися в міру посилення процесів відновлення (або зберігається

ся на тому ж рівні), може бути елімінований, або змінити „знак”, і знову наростає зі збільшенням дози, коли пошкодження переважають над відновленням [3].

Вплив йонізуючої радіації на живу систему відбувається через утворення йонів, збудження електронного стану молекул та виникнення радикалів (e_{aq}^- , H^\cdot , OH^\cdot , O_2^\cdot та ін.), а також пероксидів. Саме ці активні продукти ініціюють розвиток вільнорадикальних реакцій у водних розчинах, а також ліпідах, білках, нуклеїнових кислотах та їхніх комплексах.

Дія йонізуючого випромінювання ініціює та значно прискорює процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які розвиваються за вільнорадикальним механізмом. Перекисне окиснення ліпідів – це фізіологічний процес, який постійно відбувається у біологічних системах і зумовлений постійним контактом ліпідів біомембран із розчиненим у рідині організму молекулярним киснем, а також наявністю надзвичайно активних форм кисню. З одного боку, ПОЛ необхідне для оновлення клітинних мембран та синтезу біологічно активних сполук – простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів; з іншого боку, процеси ПОЛ трактує як універсальний механізм пошкодження біомембран, що супроводжується змінами функціонування йонотранспортувальних систем [2].

Важливу роль у захисті організму від ушкоджень унаслідок ПОЛ відіграє спеціалізована система ферментативних антиоксидантів, які захищають клітину від активних кисневих метаболітів та інактивують окремі продукти вільнорадикального окиснення.

Особливу увагу привертають порушення в ентероцитах, що становлять 80-85% від загальної кількості клітин слизової оболонки тонкого кишківника і мають значну швидкість проліферації та високу радіочутливість.

Тому метою наших досліджень було вивчення особливостей функціонування ферментів антиоксидантної системи (АОС) в епітеліальних клітинах тонкого кишківника за дії йонізуючого випромінювання низької інтенсивності, а також оцінка стану АОС після припинення дії йонізуючої радіації.

Дослідження проводили на білих безпородних щурах самках із масою тіла 150-180 г. Тварин розподіляли на три групи. До першої групи зачислили інтактних тварин, до другої – тварин, яких протягом 30 діб опромінювали дозою 0,01 Гр на апараті РУМ-17 із використанням фільтрів Cu (0,5 мм) та Al (1 мм); потужність дози – 0,000042 Гр/с; напруга 140 кВ, сила струму 4 мА, шкірно-фокусна відстань 178 см. Тварин третьої групи брали для дослідів на 40-, 50-, 60-ту доби експерименту, після припинення 30-добового опромінення.

Контрольних та дослідних тварин піддавали декапітації. Виділяли ентероцити за методом Сухомлінова та співавторів [10]. Активність супероксидисмутази (СОД) [КФ 1.15.11] визначали методом, який ґрунтується на відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами [12]. Активність каталази [КФ 1.11.16] вимірювали за швидкістю розкладу пероксиду водню [7], активність глутатйонредуктази (ГРО) [КФ 1.6.4.2] – за зниженням вмісту НАДФН [9], глутатйонпероксидазну (ГПО) активність [КФ 1.11.19] – за методом, в основі якого є розвиток кольорової реакції внаслідок взаємодії SH-груп із реактивом Елмана [8]. Концентрацію білка

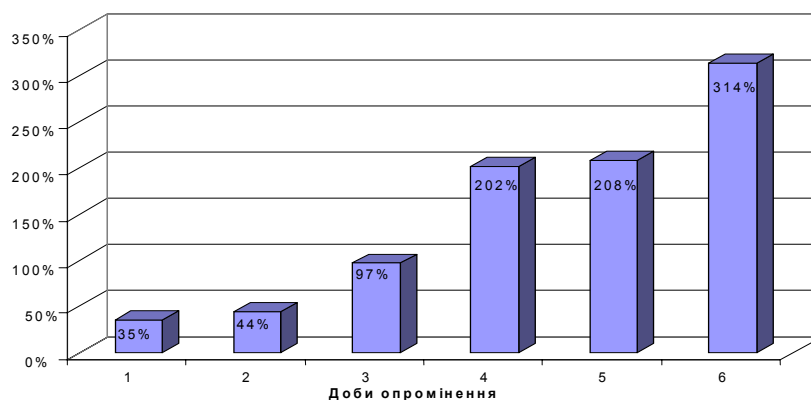


Рис. 1. Активність СОД (норма прийнята за 100%) в ентероцитах тонкого кишківника щурів у динаміці експерименту: на 10- (1), 20- (2), 30-ту (3) доби опромінення та на 40-(4), 50- (5), 60-ту (6) доби після припинення дії іонізуючої радіації.

визначали за методом Лоурі [16]. Дані опрацьовували статистично із використанням критерію Стьюдента [6].

Згідно з отриманими даними, щодобове опромінення дозою 0,01 Гр призводить до змін активності досліджуваних ферментів. Наприклад, активність супероксидисмутази достовірно знижується на 10-ту добу опромінення у 2,9 раза порівняно з контролем.

Така реакція СОД на дію низьких доз радіації може бути пов'язана з ушкодженням молекули ферменту активними продуктами ПОЛ. На 20- і 30-ту доби експерименту активність СОД дещо зростає, хоча до норми не повертається (рис. 1).

На 40- та 50-ту доби після припинення дії радіації активність СОД відновлюється і навіть удвічі перевищує значення активності ферменту, виявленої у контролі. Відновлення активності СОД можна пояснити тим, що індуковане йонізуючим випромінюванням утворення вільних радикалів стимулює синтез ферментів, зокрема СОД, генетичний контроль яких пов'язаний з активацією генів-регуляторів, що контролюють синтез СОД.

Стосовно каталази, то ми зафіксували достовірне підвищення активності ферменту на 10-ту добу експерименту у 2,5 раза, а на 20- і 30-ту доби – її зниження (зміни достовірні, $p > 0,99$). Підвищення активності каталази у перші дні опромінення зумовлена зростанням рівня активних кисневих метаболітів, що стимулює синтез ферменту. Надалі фазу початкової стимуляції змінює пригнічення активності. Зниження активності каталази зумовлене інгібувальною дією вільних радикалів на гемінове залізо активного центра ферменту.

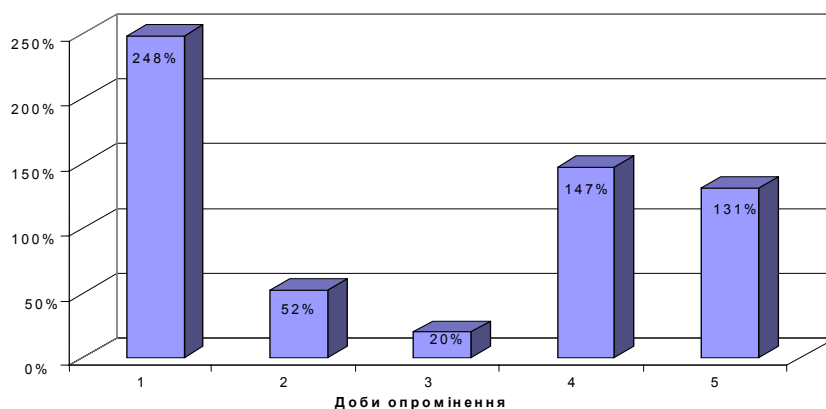


Рис. 2. Активність каталази (норма прийнята за 100%) в ентероцитах тонкого кишківника щурів у динаміці експерименту: на 10- (1), 20- (2), 30-ту (3) доби опромінення та на 50- (4), 60-ту (5) доби після припинення дії іонізуючої радіації.

З іншого боку, зниження активності каталази може бути пов'язане із недостатньою кількістю субстрату – H_2O_2 , що утворюється в супероксидисмутазній реакції, оскільки активність СОД на 20- та 30-ту доби є нижчою від норми. Після припинення впливу йонізуючої радіації на 50- і 60-ту доби активність ферменту досягає норми (рис. 2). Ці дані корелюють з активністю СОД на всі терміни післядії.

Аналогічна тенденція зафіксована і щодо глутатйонпероксидази на всі терміни опромінення. Отримані дані свідчать про підвищену, порівняно із контрольними даними, активність ГПО на 10- (у 6.5 раза) та 30-ту (у 2.7 раза) доби. Посилення активності ГПО можна пояснити активацією ферменту продуктами окиснення ненасичених жирних кислот. На 20-ту добу активність ГПО дещо послаблюється (у 1.6 раза порівняно із контролем та у 10.2 раза стосовно 10-ї доби). Зниження активності є результатом зменшення концентрації глутатйону – донора водню. На всі терміни післядії активність ГПО вища від норми (рис.3).

Спорідненість ГПО до H_2O_2 вища, ніж у каталази, тому ГПО ефективніше працює за низьких концентрацій субстрату, тоді як у захисті клітин від окиснювального стресу, зумовленого високими концентраціями H_2O_2 , ключову роль відіграє каталаза.

Ці дані узгоджуються із нашими результатами. Наприклад, на першому етапі опромінення ефективніше працює ГПО (активність ГПО перевищує активність каталази у 2,6 раза). На 20-ту добу опромінення активність каталази і ГПО перебуває приблизно на одному рівні, нижчому від норми, після чого активність каталази ще послаблюється, а активність ГПО посилюється, що може свідчити про підвищену стійкість ГПО до уражуючої дії радіації (порівняно із каталазою) або про наявність

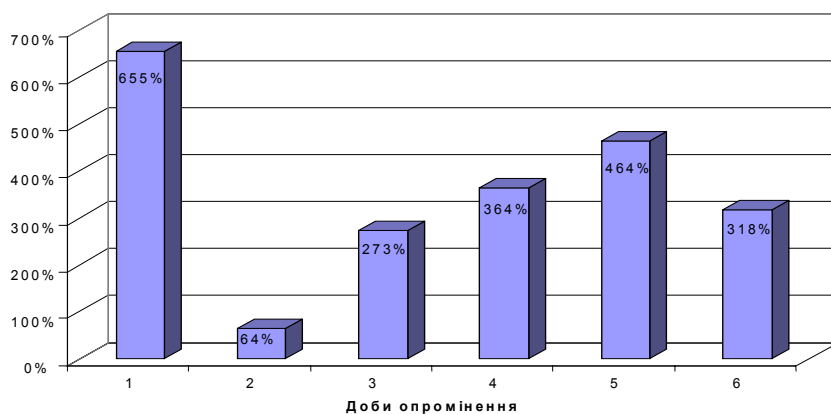


Рис. 3. Активність ГПО (норма прийнята за 100%) в ентероцитах тонкого кишківника щурів у динаміці експерименту: на 10- (1), 20- (2), 30-ту (3) доби опромінення та на 40- (4), 50- (5), 60-ту (6) доби після припинення дії іонізуючої радіації.

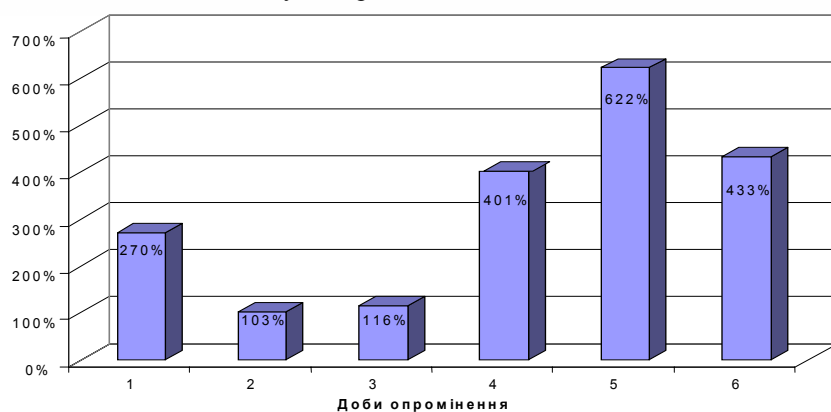


Рис. 4. Активність ГР (норма прийнята за 100%) в ентероцитах тонкого кишківника щурів у динаміці експерименту: на 10- (1), 20- (2), 30-ту (3) доби опромінення та на 40- (4), 50- (5), 60-ту (6) доби після припинення дії іонізуючої радіації.

підвищеної кількості органічних гідроперекисів та відновленого глутатйону, що є субстратами для ГПО (рис. 2, 3).

Функціонування ГПО тісно пов'язане із функціонуванням глутатйонредуктази. Згідно з отриманими результатами, активність глутатйонредуктази в ентероци-

тах є вищою від норми на 10- та 30-ту доби опромінення, причому максимум активності простежується на 10-ту добу, тоді як на 20-ту є в межах норми (рис. 4).

Наведені дані корелюють з активністю ГПО. Посилення активності ГПО веде до зростання рівня окисненого глутатйону, який відновлюється ГР. Після припинення дії радіації ферментативна активність є не тільки вищою від норми, а й перевищує активність досліджуваного ферменту за вражуючої дії йонізуючої радіації.

Як відомо, біологічні процеси мають певну циклічність (добові, тижневі, сезонні коливання) і є хвильовими. Циклічність таких процесів може бути пов'язана з дією біологічно активних речовин (гормонів, гормонодів, клітинних месенджерів тощо). Дія екстремальних факторів, таких як опромінення, підвищена температура, малігнізація клітин може зумовити підсилення меж коливань завдяки реалізації різних механізмів, у тому числі біосинтезу ізоферментних форм або й модифікації вже наявних. Особливо суттєвими такі впливи стають за умов „мовчання” репараційних систем, коли, наприклад, поглинуті дози йонізуючого випромінювання є досить малими.

1. *Барабой В.А.* Особенности биологического действия ионизирующего излучения в малых дозах // *Врачеб. дело.* 1991. №7. С. 75-93.
2. *Барабой В.А., Олійник С.А., Хмельський Н.Ю.* Стан антиоксидантної системи за дії йонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності // *Укр. біохім. журн.* 1994. Т. 66. №4. С. 3-18.
3. *Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н., Горбунова Н.В.* и др. Особенности биологического действия малых доз облучения. // *Радиац. биол. Радиоэкол.* 1996. Т. 36. №4. С. 610-631.
4. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 259 с.
5. *Гродзінський Д.М.* Радіобіологія : навч. посібник. К.: Либідь, 2000. С. 447
6. *Деркач М.* Основи біофізики. Львів: вид-во ун-ту, 1967. 277 с.
7. *Королюк М.А., Иванова И.Г., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.* 1988. №1. С. 16-18.
8. *Манн В.М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // *Лаб. дело.* 1986. №12. С. 124.
9. *Методы биохимических исследований /* Под ред. М.И. Прохоровой. Ленинград, 1982. 272 с.
10. *Сухомлинов Б.Ф., Федорович А.Н., Чайка Я.П.* К методике получения интактных энтероцитов слизистой двенадцатиперстой кишки // *Укр. биохим. журн.* 1983. Т. 55. №2. С. 199-201.
11. *Чайка Я.П., Пермякова Н.Ю., Гресько О.Я.* Вплив йонізуючого випромінювання на активність та ізоферментний спектр глюкозо-6-фосфатдегідрогенази ентероцитів тонкого кишківника щурів // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біол.* 2001. Вип. 27. С. 25-29.

12. Чевари С., Андял Т., Штиренгер Д. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте // Лаб. дело. 1991. №10. С. 9-13.
13. Эйдус Л.Х. О едином механизме инициации различных эффектов малых доз ионизирующих излучений // Радиационная биология и радиационная экология. 1996. Т. 36. С. 874-882.
14. Kovarova H., Krisala M., Dostal M. Activiti of superoxyde dismutase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutatione reductase //Cell. Biochem. And Funct. 1987 / Vol. 5. №1. P. 41-43.
15. Lloid D.C., Edwards A.A., Leonard A. et al. / Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays / Nat. Radiol. Protection Board Hilton // Int. J. Radiat. Biol. 1992. Vol. 61. №3. P. 335-343.
16. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. boil. Chem. 1051. Vol. 193. №1. P. 404-415.
17. Nakasava T., Nagatsuka S. Radiation-induced lipid peroxidation and membrane permeability in liposome // Intern. J. Radiat. Biol. 1980. Vol. 38. №5. P. 537-544.

THE STUDY OF SEPARATE ENZYMES OF ANTIOXIDANT ENTEROCYTE SYSTEM OF THE DUE TO THE CONDITION OF LOW INTENSITY X-RAY IRRADIATION

G. Kleveta, Ya. Chayka, L. Starikovich, T. Vigovska

*Ivan Franko National Universiti of L'viv,
Hrushevskogo St. 4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: kfbh@franko.lviv.ua*

There was conducted the examination of the main enzymes activity of antioxigen defence (AOD): superoxide dismutase, katalase, glutation peroxidase (GPO) and glutatione reductase (GR) in the epithelial cells of mucous membrane of rats according to the daily ionized irradiation in 0,01G during 30 days and after ceasing of low intensity X-ray irradiation influence.

There was determined the changes in the activity of examined enzymes due to chronic action of X-ray irradiation for all terms of irradiation and after the ceasing of radiation action. It was shown that the character of there changes depended on the dosage of irradiation and the time term that had passed since the beginning of irradiation.

Key words: ionized irradiation, low intensity, enterocyte, superoxide dismutase, katalase, glutation peroxidase, glutatione reductase.

Стаття надійшла до редколегії 12.02.2001
Прийнята до друку 26.02.2002