Г. А. ПАНОСЯН

ДЕЙСТВИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ОПЫТАХ *in vitro*

Изменения холинэстеразной активности, наблюдаемые при действии на организм ионизирующей радиации [3, 5, 8, 9, 11, 12], могут зависеть от нескольких моментов: а) непосредственного действия ионизирующей радиации на молекулу холинэстеразы, б) непосредственного действия продуктов радиолиза воды на молекулу холинэстеразы, в) непосредственного действия вторичных продуктов обмена пораженного организма на молекулу холинэстеразы и г) действия облучения, продуктов радиолиза воды и вторичных продуктов патологического обмена на системы, участвующие в синтезе и разрушении холинэстеразы сыворотки крови или тканей.

Само собой разумеется, что определить какой из этих моментов превалирует в той или иной стадии лучевого поражения и каково их соотношение в итоговой картине изменения холинэстеразной активности, представляет определенный интерес.

О непосредственном действии ионизирующей радиации и продуктов радиолиза воды на молекулу холинэстеразы можно судить по результатам опытов, проведенных *in vitro*.

Многочисленные работы указывают, что белковые молекулы и молекулы ферментов, облученных в опытах *in vitro*, подвергаются часто резким изменениям [1, 2] даже при относительно малых дозах облучения. При этом наблюдается резкое изменение физико-химических свойств белков как простых, так и сложных. Изменяется вязкость, различные спектры белков, поведение их по отношению к действию температуры и спирта и т. д., что свидетельствует о начале денатурационных изменений макромолекулы белка. Для выявления подобных изменений необходимы довольно большие дозы ионизирующей радиации, порядка нескольких десятков тысяч рентген. Однако в некоторых случаях, когда были использованы более тонкие и чувствительные методы измерения изменений физико-химических свойств белков, удалось обнаружить изменения свойств белков сыворотки при облучении дозами 200—1000 р.

Еще более резкие изменения наблюдаются в поведении ферментов при облучении *in vitro*. При этом сульфгидрильные ферменты обладают гораздо большей чувствительностью к ионизирующей радиации. Бэррон [7] объясняет это тем, что активные сульфгидрильные группы этих ферментов реагируют с продуктами радиолиза воды и тем самым инактивируются, в то время как инактивация других ферментов является след-

ствием уже денатурационных изменений самой белковой молекулы, что наступает при гораздо больших дозах облучения.

Следовательно, естественно было предположить, что подобным изменениям должна подвергаться и холинэстераза. Однако имеющиеся в литературе данные говорят об обратном. Так, например, Аугустинссон [6] показал, что облучение рентгеновскими лучами гомогенатов кишок животных при облучении *in vitro* дозой в 3000 р не вызывало инактивации холинэстеразы, в то время как в опытах *in vivo* холинэстераза подвергается резким изменениям при гораздо меньших дозах [8]. Подобный же результат получили Орд и Стокен [12], которые облучали плазму морской свинки *in vitro* в дозе 1000 р γ -лучами и не получили инактивации холинэстеразы ни в присутствии ни в отсутствии кислорода.

Сабин [13] показала, что при облучении сыворотки крысы рентгеновскими лучами в дозе 100 000 р холинэстеразная активность не меняется. При действии рентгеновских лучей в дозе 150 000 р на гемолизаты крови человека наблюдалось инактивирование холинэстеразы на 10%. Гораздо чувствительнее холинэстераза сыворотки крови овцы, которая инактивировалась на 15%, и иногда до 25%, при действии дозы в 100 000 р.

Из этих опытов можно заключить, что если инактивирование холинэстеразы при облучении *in vitro* и имеет место, то для этого необходимы гораздо большие дозы, чем при облучении *in vivo*.

Однако мы при этом должны учитывать, что молекула холинэстеразы в опытах *in vitro* и *in vivo* находятся в разных условиях. Если в облученной сыворотке молекула холинэстеразы фактически находится в среде, которая не подвергается какому-либо существенному воздействию со стороны внешней среды (при соответствующем хранении), то в организме облученная молекула холинэстеразы находится в довольно сложной, непрерывно изменяющейся среде, причем в такой среде, где незначительные, незаметные экспериментатору изменения в молекуле холинэстеразы, уже при помощи вторичных реакций, могут служить причиной резкого изменения его поведения и активности.

Кроме того, необходимо предположить, что вряд ли любое изменение в молекуле холинэстеразы должно обязательно привести к изменению активности фермента. Подобные изменения могут служить причиной инактивирования лишь в том случае, когда фермент находится в среде, где имеются довольно сложные системы, взаимодействующие с молекулой холинэстеразы, когда изменения, имеющиеся в молекуле фермента, сами по себе не приводят к инактивированию, однако в результате взаимодействия с этими системами (например, протеолитические и др. системы) уже вторично приводят к инактивированию.

Исходя именно из этих соображений, мы попытались выяснить, действует ли ионизирующая радиация на молекулу холинэстеразы при малых дозах облучения, получить изменения не только холинэстеразной активности, но и поведения холинэстеразы в различных условиях, кото-

рое может косвенно говорить об изменении физико-химического состояния фермента.

Для этой цели мы использовали полученные нами данные по поведению холинэстеразы сыворотки в кислой среде, что, безусловно, говорит об изменении физико-химического состояния холинэстеразы.

Нами было показано, что инкубация сывороточной холинэстеразы в кислой среде приводит к потере активности. Причем при определенных значениях рН, в зависимости от времени инкубации, наблюдается «флюктуация» холинэстеразной активности, то-есть колебательные изменения активности фермента. Из этих опытов было заключено, что «флюктуация» активности, наблюдаемая в этих условиях, по всей вероятности, зависит от колебательных изменений либо физико-химических свойств белковой молекулы фермента, либо от «флюктуации» свойств других белковых молекул, имеющих в сыворотке [4].

В данной работе мы использовали этот феномен с двойной целью: во-первых, для того, чтобы, как это было сказано выше, иметь тест физико-химического состояния сывороточной холинэстеразы для более точного определения чувствительности холинэстеразы к облучению в опытах *in vitro* и, во-вторых, чтобы определить, как изменяется «флюктуация» и инактивация холинэстеразы в кислой среде при облучении сыворотки с тем, чтобы уяснить себе природу этого интересного феномена.

В наших опытах мы использовали свежеполученную сыворотку человека. Холинэстеразная активность определялась обычным титрационным методом (титрация 0,05N раствором NaOH). Изменение кислотности среды достигалось добавлением в реакционную смесь (сыворотка, физиологический раствор, индикатор) разных количеств 0,1N раствора HCl. «Флюктуация» активности определялась измерением активности холинэстеразы через каждую минуту после нейтрализации среды в течение 10 мин. Для определения степени воздействия кислотности среды на холинэстеразную активность брались средние значения за 10 мин., которые, несмотря на «флюктуацию», довольно точно характеризуют степень воздействия кислоты на активность холинэстеразы.

Сыворотка облучалась рентгеновым аппаратом РУМ-11 при следующих условиях: 187 кУ, 10 мА, 30 см, без фильтра, мощность—80 р/мин. Одна и та же сыворотка делилась на пять равных частей, из которых одна служила контролем, а другие облучались дозой в 1000 р, 5000 р, 10 000 р и 25 000 р. Холинэстеразная активность определялась на 1, 2, 3, 5, 9 день после облучения сыворотки. Действие кислот на холинэстеразную активность определялось в 1 и 5 день после облучения. Кроме того, определялась зависимость холинэстеразной активности от концентрации ацетилхолина и торможение холинэстеразной активности на 50% при действии эзеринном (I_{50}) (5 день после облучения).

Поскольку характер «флюктуации» и кислотное инактивирование зависят от рН среды, мы определяли последнее нормальной и облученной сыворотки как до, так и после добавления кислоты (колориметри-

ческий метод Михаэлиса). Как показывают данные табл. 1, никакого изменения рН сыворотки при облучении дозами до 25 000р не наблюдается, не изменяется также буферное свойство сыворотки в условиях нашего опыта.

Таблица 1
рН нормальной и облученной сыворотки (в реакционной смеси)

Количество 0,1N HCl	Норма	1000 р	5000 р	25000 р
0,0	7,6	7,6	7,6	7,6
0,1	4,2	4,2	4,2	4,2
0,15	3,6	3,6	3,6	3,6
0,20	3,2	3,2	3,2	3,2

Таблица 2
Холинэстеразная активность нормальной и облученной сыворотки
(в мл 0,05N NaOH)

Дни после облучения	Норма	1000 р	5000 р	10000 р	25000 р
I	0,101	0,106	0,105	0,105	0,103
	0,102	0,105	0,095	0,102	0,100
	0,100	0,103	0,104	0,099	0,104
II	0,093	0,097	0,100	0,099	0,097
	0,094	0,095	0,095	0,096	0,090
	0,094	0,094	0,097	0,091	0,089
III	0,096	0,097	0,091	0,093	0,093
	0,091	0,095	0,095	0,094	0,091
	0,094	0,096	0,093	0,091	0,095
V	0,104	0,115	0,102	0,108	0,106
	0,104	0,112	0,107	0,109	0,105
	0,102	0,107	0,107	0,104	0,108
IX	0,113	0,121	0,120	0,113	0,117
	0,113	0,115	0,115	0,116	0,114
	0,115	0,116	0,116	0,116	0,118

Как видно из данных табл. 2, холинэстеразная активность облученной сыворотки существенно не меняется. Лишь при облучении дозой в 1000 р наблюдается незначительное увеличение активности холинэстеразы в пределах 3—4%. Не наблюдается какого-либо изменения также и в I_{50} для эрозина (табл. 3) и в зависимости холинэстеразной активности от концентрации субстрата. Таким образом, наши опыты подтверждают известный в литературе факт большой резистентности холинэстеразы по отношению к облучению *in vitro*, если судить об этом по холинэстеразной активности, и по состоянию его активного центра (о чем, по-видимому, могут говорить опыты с антихолинэстеразными веществами и зависимость активности от концентрации субстрата).

Таблица 3

Концентрации эзерина, вызывающие торможение холинэстеразы нормальной и облученных сывороток на 50% (f_{50})

Норма	1000р	5000р	10000р	25000р
$6,9 \cdot 10^{-8}$	$7,1 \cdot 10^{-8}$	$6,6 \cdot 10^{-8}$	$6,8 \cdot 10^{-8}$	$6,8 \cdot 10^{-8}$

Опыты же с действием кислоты на холинэстеразную активность показывают следующее (табл. 4).

Нормальная сыворотка, как и следовало ожидать, с увеличением кислотности среды проявляет закономерное уменьшение активности холинэстеразы; одновременно наблюдается «флюктуация». Облученная сыворотка также изменяет свою активность, причем характер изменения тот же, что и у нормальной сыворотки. Однако в количественном отношении наблюдается довольно значительное различие. Наблюдается довольно закономерное «ускользание» из-под действия кислот. При действии одного и того же количества кислоты облученная сыворотка оказывается более активной, чем нормальная. Это заметно как в первый

Таблица 4

Действие 0,1N HCl на холинэстеразную активность нормальной и облученной сыворотки (в % к исходной активности)

Дни после облучения	Количество HCl в мл	Момент нейтрализации	Норма	1000р	5000р	10000р	25000р
1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 мл pH 4,2		1 мин.	88	94	89	92	95
		2 .	102	93	92	99	93
		3 .	96	93	88	86	91
		4 .	92	93	86	90	90
		5 .	96	87	84	93	89
		6 .	99	92	89	95	89
		7 .	103	91	74	94	90
		8 .	100	80	81	84	90
		9 .	99	88	84	86	90
		10 .	100	92	88	77	90
0,15 мл pH 3,6		1 мин.	64	76	50	80	78
		2 .	57	68	59	80	66
		3 .	34	45	23	56	58
		4 .	31	30	26	44	53
		5 .	26	38	18	42	56
		6 .	20	23	24	66	60
		7 .	23	20	22	40	55
		8 .	26	22	18	73	50
		9 .	25	26	26	78	40
		10 .	30	44	30	67	78
0,2 мл pH 3,2		1 мин.	31	46	76	27	38
		2 .	49	30	52	21	26
		3 .	25	18	24	46	21
		4 .	17	25	48	17	21
		5 .	18	17	22	19	24
		6 .	15	17	49	53	21
		7 .	16	19	68	8	17
		8 .	15	21	53	62	17
		9 .	14	17	17	46	20
		10 .	16	19	25	27	20

Продолж. табл. 4

1	2	3	4	5	6	7	8
V	0,1 мл рН 4,2	1 мин.	90	92	96	101	97
		2 .	89	94	96	100	101
		3 .	94	86	94	101	99
		4 .	97	81	95	99	97
		5 .	93	90	97	98	95
		6 .	90	91	94	100	96
		7 .	93	91	95	99	99
		8 .	95	91	96	100	98
		9 .	89	90	96	99	91
		10 .	91	93	96	101	98
	0,15 мл рН 3,6	1 мин.	54	54	76	73	65
		2 .	45	40	54	62	52
		3 .	37	54	45	66	39
		4 .	33	30	37	45	30
		5 .	27	27	35	37	28
		6 .	30	21	30	35	29
		7 .	28	20	30	39	28
		8 .	23	24	30	31	25
		9 .	23	23	28	26	27
		10 .	23	17	30	36	25
	0,2 мл рН 3,2	1 мин.	57	42	58	46	45
		2 .	30	36	46	36	32
		3 .	28	31	36	27	28
		4 .	17	27	28	24	23
		5 .	18	23	27	28	22
		6 .	16	29	23	25	20
		7 .	13	28	26	24	16
		8 .	17	18	25	23	16
		9 .	19	18	25	28	18
		10 .	17	42	25	21	18

день после облучения, так и в пятый. В последнем случае изменения меньше выражены.

«Флюктуация» во всех случаях сохраняется и довольно хорошо выражена у облученных сывороток независимо от дозы облучения в первый день после облучений и при дозе в 1000р в пятый день после облучения.

Такое поведение холинэстеразной активности облученной сыворотки наводит на мысль, что при облучении происходят такие изменения в сыворотке, которые приводят к «активированию» инактивированного фермента холинэстеразы. Каков механизм этого процесса, сказать трудно, так как имеем дело со сложной системой, где имеются, кроме фермента, который и подвергается воздействию, и другие белковые компоненты, которые, изменяясь сами, могут вторично влиять на активность фермента.

Таким образом, из приведенных опытов можно заключить, что, несмотря на отсутствие какого-либо изменения в активности холинэстеразы сыворотки при облучении сыворотки *in vitro* дозами до 25 000р, физико-химическое состояние холинэстеразы определенным образом изменяется, о чем можно судить по ее поведению в кислой среде. Для понимания природы подобного изменения, а также «флюктуации» холин-

эстеразной активности и инактивирования холинэстеразы в кислой среде, необходимо провести опыт с очищенной холинэстеразой.

Кафедра физиологии человека и животных
Ереванского государственного университета

Поступило 15.II 1961 г.

Գ. Չ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՌԵՆՏԳԵՆՅԱՆ ՃԱՌԱԳՍՅԹՄԱՆ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՐԴՈՒ ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ
ԽՈՒԻՆՔՍԹԵՐԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ՝ *in vitro* ՓՈՐՉԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցությունը 1000, 5000, 10000, 25000 ռենտգեն դոզայով մարդու արյան շիճուկի խոլինէսթերազայի ակտիվության, այդ ակտիվության սուբստրատի կոնցենտրացից կախվածության, էզերինով խոլինէսթերազայի արգելակման աստիճանի, խոլինէսթերազայի ակտիվության վրա թթվային միջավայրի ազդեցության աստիճանի և թթվային միջավայրում խոլինէսթերազայի ակտիվության «ֆլյուկտուացիայի» վրա:

Ցույց է տրված, որ խոլինէսթերազայի ակտիվությունը չի փոխվում շիճուկը ռենտգենյան ճառագայթման բոլոր օդտազորովելիք դոզաների դեպքում ինչպես առաջին, այնպես էլ ճառագայթման հաջորդ օրերում: Նկատվում է միայն ակտիվության մի փոքր բարձրացում (3—4%) շիճուկի՝ 1000 ռենտգեն դոզայով ճառագայթման ժամանակ:

Խոլինէսթերազայի ակտիվության արգելակումը էզերինով 50% չափով և խոլինէսթերազայի ակտիվության կախումը սուբստրատի կոնցենտրացիայից չի փոխվում:

Ցայտուն կերպով նկատվում է տարբերությունը նորմալ և ճառագայթված շիճուկների վերաբերմունքների միջև թթու միջավայրում: Ճառագայթված շիճուկի վրա թթվով ազդելիս նկատվում է խոլինէսթերազայի ակտիվության բարձրացում նորմալ շիճուկի նկատմամբ: Ընդ որում ճառագայթման դոզայի ավելացումը բարձրացնում է խոլինէսթերազայի ակտիվությունը:

Ճառագայթված շիճուկում, ինչպես և նորմալ շիճուկում, որոշակի քանակով թթուների ազդման դեպքում նկատվում է խոլինէսթերազայի ակտիվության «ֆլյուկտուացիա»: Բերված փորձերից կարելի է հանգել այն եզրակացության, որ շնայած խոլինէսթերազայի ակտիվության շփոփոխվելու, ռենտգենյան ճառագայթներով մինչև 25000 ռենտգեն *in vitro* ճառագայթման դեպքում, խոլինէսթերազայի ֆիզիկա-քիմիական վիճակը որոշակի կերպով փոփոխվում է, որի մասին կարելի է դատել խոլինէսթերազայի վերաբերմունքով թթու միջավայրում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дейл В. В кн.: Радиобиология, стр. 207—220, ИЛ, 1955.
2. Кузин А. М. В кн.: Очерки по радиобиологии, стр. 5—96, 1956.
3. Мозжухин А. С., Певзнер Д. А. Бюлл. эксп. биол. и мед., 48, 9, 34—37, 1959.
4. Паносян Г. А. Известия АН АрмССР (биологические науки), т. XIV, 8, 29—39, 1961.
5. Пономаренко Н. Е. Мед. радиология, 1, 5, 13, 1956.
6. Augustinsson K. Acta physiol. scand 15, suppl, 52, 1, 1948.
7. Barron E. S. G., Dickman Sh., Muntz A., Singer Th. P. J. Gen. Physiol. 32, 537—552, 1949.
8. Burn J. H., Kordik P., Mole R. Brit. j. Pharmacol., 7, 58, 1952.
9. Conard R. A. Am. j. Physiol. VIII, 170, 2, 418, 1952.
10. Doull J., Cummings O. K. Federation Proc, 13, 350, 1954.
11. French A. B., Wall P. E. Am. J. Physiol., 188 (1), 76—80, 1957.
12. Ord M. G., Stocken L. A. Physiol. Rev. 33, 3, 356—386, 1956.
13. Sabine J. C. Am. J. Physiol. 187 (2), 280—282, 1956.