

УДК 617—001.28—06—073.75

Г. К. ПАРСАДЯН, А. А. СИМОНЯН, Л. П. ТЕР-ТАТЕВОСЯН

ВЛИЯНИЕ ОБЩЕГО РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА
АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНО-
ФОСФОРНОГО ОБМЕНА В ТКАНЯХ КУР

Изучена динамика активности АТФ-азы, гликогенфосфорилазы и фосфопротеинфосфатазы сердца и печени кур при общем лучевом поражении. Предполагается, что снижение АТФ-азной и повышение фосфорилазной активности в репаративной фазе развития лучевой болезни является компенсаторной реакцией, возмещающей дефицит АТФ в условиях разобщения окислительного фосфорилирования.

К настоящему времени накопилось значительное количество фактов, свидетельствующих о нарушении дыхания и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования при облучении, о большой роли этих процессов в патогенезе пострадиационных изменений различных органов и тканей [1, 6]. В обычных условиях главным источником АТФ (до 80—90%) для большинства животных организмов служит сопряженное с дыханием фосфорилирование адениловых нуклеотидов. Однако в облученном организме наступает выраженное разобщение окислительного фосфорилирования. Еще в 1952 г. Ashwell et al. [12], а также Potter [16] обнаружили быстрое понижение способности связывать неорганический фосфат в селезенке животных, облученных сублетальными дозами (650—800 р). Позднее было установлено, что нарушения в аэробной фазе гликолиза проявляются не только в начальном периоде развития лучевой болезни, но и в более отдаленные сроки—на 7, 14, 30-е сутки после облучения крыс в дозе 600 р [4, 7].

Ввиду нарушений в аэробной фазе гликолиза особое место приобретает альтернативный механизм синтеза АТФ в аэробной фазе гликогенолиза и гликолиза. Однако деятельность ферментов, участвующих в утилизации гликогена при лучевой болезни, изучена в гораздо меньшей степени. Мало освещенным также остается вопрос о состоянии гидролиза АТФ. Между тем баланс этого макроэргического соединения в тканях пораженного организма обеспечивается не только интенсивностью синтеза, но и распада АТФ.

Следует также отметить, что большинство исследований, посвященных действию радиации на фосфорный обмен, проводилось на радиочувствительных тканях—селезенке, вилочковой железе, печени, в то время

как так называемым радиорезистентным тканям уделялось гораздо меньше внимания.

Для пополнения сведений о характере патологических и репаративных процессов, развивающихся в радиочувствительных и резистентных тканях при тотальном рентгеновском облучении, изучена активность ряда ферментов фосфорного обмена—АТФ-азы (К. Ф. 3. 6. 1. 3), фосфопротеинфосфатазы (ФПФ-аза; К. Ф. 3. 1. 3. 16) и гликоген-фосфорилазы (К. Ф. 2. 4. 1. 1) в некоторых тканях у кур.

Материал и методика

Для целей эксперимента использованы гексокиназа фирмы «Sigma» (США), АМФ, АТФ, глюкозо-1-фосфат и казенин (чистый по Хаммарстену) фирмы «Реанал» (ВНР), гликоген производства Олайнского завода химреактивов.

Работа выполнялась на курах белой русской породы. Кур подвергали однократному рентгеновскому облучению в дозе 800 р на аппарате РУМ-11 при напряжении 200 кВ и силе тока 15 мА; фокусное расстояние—60 см; фильтры—0,5 мм Си и 0,1 мм Аl.

Ткани мозга извлекали на холоду на 3, 7, 14 и 21-й день после облучения. Измельчение ткани проводили в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в течение 30 сек в 0,25М сахарозе—0,01М трис НСl буфере, рН 7,4 (разведение 1 : 9). Ядерную фракцию выделяли при 800 г в течение 10 мин в среде выделения.

Поглощение кислорода митохондриями измеряли манометрическим методом Варбурга (по [8]). Субстратом окисления в инкубационной смеси являлся сукцинат (60 мкМ). Об интенсивности окислительного фосфорилирования судили по убыли неорганического фосфата в среде в результате его эстерификации. Активность АТФ-азы определяли по В. П. Скулачеву [8]. Для определения активности ФПФ-азы пользовались методом Feinstein et Folk [14] с некоторыми модификациями [5]. Для определения тотальной фосфорилазной активности (фосфорилаза А и Б) пользовались методом Cory et Ullingworth [13] в направлении синтеза гликогена. Количество высвобождаемого в ферментативных реакциях неорганического фосфата определяли по Taussky et Shorr [17]. Белок во фракциях определяли по Lowry и сотр. [15].

Результаты и обсуждение

Облучение организма в дозе 800 р приводило к определенным сдвигам в активности АТФ-азы печени кур (таблица). АТФ-азная активность надмитохондриальной жидкости несколько снижается к третьим суткам после облучения. Вследствие включения защитных систем организма активность этого фермента постепенно повышается и на 14-й день лучевой болезни вновь достигает нормы. Развивающееся поражение организма приводит, однако, к значительному падению (более чем на 40%)

ФФФ-азной активности надмитохондриальной фракции в более поздние сроки лучевой болезни. Митохондриальная АТФ-аза печени оказалась более чувствительной к воздействию рентгеновского облучения. После небольшого повышения активности (на 3-и сутки) следовало устойчивое понижение АТФ-азной активности этой фракции в течение всего последующего хода лучевой болезни. Наблюдаемые изменения в активности АТФ-азы митохондриальной печени могут быть непосредственно связаны с физико-химическими нарушениями их субмикроскопической структуры.

Т а б л и ц а

Изменение активности АТФ-азы в субклеточных фракциях тканей кур при тотальном облучении в дозе 800 р. Р_{II} в мкатамах/мг белка за 30 мин

Ткань	Субклеточная фракция	Контроль	Дни облучения			
			3	7	14	21
Сердце	митохондрии	3,81	2,67	3,25	2,80	2,33
Сердце	надмитохондриальная фракция	3,91	1,94	2,87	3,25	2,58
Печень	митохондрии	3,42	3,77	2,53	2,51	2,59
Печень	надмитохондриальная фракция	3,72	2,86	3,10	4,02	2,10

В сердечной мышце наиболее значительное понижение активности АТФ-азы как митохондриальной, так и надмитохондриальной фракции отмечено на третьи сутки после тотального облучения кур. Такое подавление АТФ-азной функции можно рассматривать как компенсаторную реакцию организма в ответ на глубокое разобщение окислительного фосфорилирования, наблюдаемого на 3—7-е сутки после облучения [4, 7]. Вполне допустимо поэтому заключить, что понижение уровня АТФ и промежуточных макроэргических интермедиаторов не может быть обусловлено повышением АТФ-азной активности. В более поздние сроки (7—14-е сутки) активность АТФ-азы сердечной мышцы несколько повышается, однако к 21-му дню лучевой болезни, когда происходят грубые деструктивные нарушения ультраструктуры клеточного аппарата, наступает вторичное угнетение АТФ-азной активности.

Торможение аэробного дыхания в облученном организме сопровождается возрастанием анаэробного обмена [6]. Установлено, что в печени, сердце и мозге крыс после облучения имеет место накопление пирувата и сукцината, тогда как количество α -кетоглутарата, фумарата и малата остается на уровне нормы [6]. Исследование содержания пирувата, лактата и отношения лактат/пируват в различных органах крыс при рентгеновском и γ -облучении показало, что в радиочувствительных и радиорезистентных органах изменения этих показателей неоднозначны и противоречивы [2]. Наряду с этим активность гликоген-фосфоорилазы—ключевого фермента деградации гликогена на пути анаэробного дыхания в условиях лучевой болезни—остается малоизученной. На рис. 1, а, б представлены данные о динамике фосфоорилазной активности в сердце и

печени кур после рентгеновского облучения. До седьмого дня тотальная фосфорилазная активность в постмитохондриальной фракции сердца нарастает, после чего уровень ее понижается и к 21-му дню после облучения не превышает соответствующих значений у контрольных животных.

Во фракции митохондрий сердца фосфорилазная активность незначительна и при облучении непрерывно снижается во все исследуемые сроки. Отмеченные сдвиги в активности фосфорилазы в целом повторяются и в печени облученных кур. Так, в конце первой недели отмечено почти двукратное повышение активности фермента в объединенной микросомально-цитоплазматической фракции, которое в последующие сроки исчезает. Изменения в активности митохондриальной фосфорилазы в этих условиях менее выражены. Полученные результаты (рис. 1,

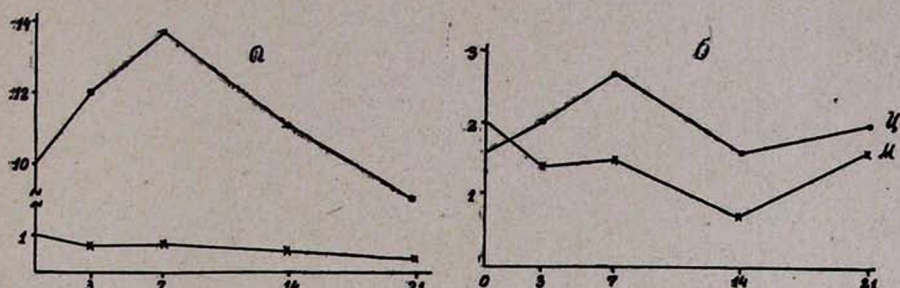


Рис. 1. Динамика активности фосфорилазы а) в сердце, б) в печени крыс в ходе развития лучевой болезни. По вертикали: активность фермента в мкатомах Рн/мг белка /мин; по горизонтали: дни после облучения в дозе 800 р. м—митохондриальная фракция, ц—надмитохондриальная надосадочная.

а, б) вновь подтверждают предположение о мобилизации компенсаторных механизмов тканей пораженного организма к концу первой недели после облучения.

Как известно, ряд ферментов углеводного и липидного обмена (и в том числе фосфорилаза) являются фосфопротеинами, и активность их регулируется универсальным механизмом фосфорилирования/дефосфорилирования, приводящим к постсинтетической модификации молекул ферментов. Кроме того, матричная активность хроматина находится в зависимости от степени фосфорилированности ядерных белков, которая, в свою очередь, обусловлена деятельностью протеинкиназы и ФПФ-азы. Показано, что облучение ядер и хроматина из печени и тимуса крыс *in vitro* в дозе 20 крад снижает протеинкиназную активность негистоновых белков хроматина на 15—20% [3]. Корреляция между скоростью синтеза РНК и фосфорилированием ядерных белков печени крыс обнаружена и при облучении *in vivo* [9, 10]. В то же время активность ФПФ-азы в условиях радиационного поражения тканей до настоящего времени не изучалась.

Согласно нашим данным (рис. 2а), ФПФ-азная активность цитоплазмы и микросом печени нарастает к 14-му дню после тотального облуче-

ния кур. Эти данные коррелируют с определенным понижением фосфоорилазной активности в печени облученных кур в те же сроки лучевой болезни. По-видимому, это понижение активности связано с переходом активной формы фермента—фосфоорилазы А в неактивную дефосфоформу—фосфоорилазу Б. Что касается активности митохондриальной ФПФ-азы, то после небольшого повышения на 7-й день она неуклонно снижалась и к 21-му дню после облучения составляла около половины нормы.

ФПФ-аза митохондрий сердца крыс оказалась весьма резистентной к облучению (рис. 2,б), тогда как активность фермента из надмитохондриальной фракции подвергается более существенным колебаниям. В конечном итоге через три недели после облучения в дозе 800 р активность ФПФ-азы, как и многих других ферментов, резко снижается.

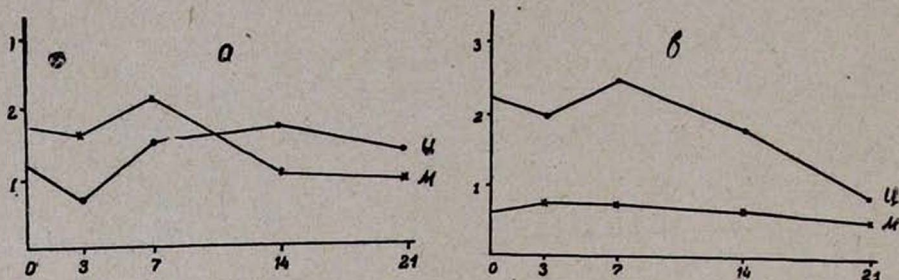


Рис. 2. Динамика активности ФПФ-азы а) в печени, б) в сердце крыс в ходе развития лучевой болезни. По вертикали: активность фермента в *мкатомах* Рн/мг белка/час; по горизонтали: дни после облучения в дозе 800 р. м.—митохондриальная фракция, ц—надмитохондриальная надосадочная.

Экспериментальные данные по действию радиации на фосфорный обмен довольно разнородны и с трудом поддаются систематике и обобщению. Все это затрудняет расшифровку сущности и механизма биологического действия радиации на ферменты углеводно-фосфорного обмена. На результатах сказываются условия эксперимента: вид животного, исследуемый орган, доза облучения и др [1, 11].

Наши данные подтверждают предположение о том, что резервы организма при сублетальных дозах облучения в основном исчерпываются к седьмому дню лучевой болезни, после чего начинают превалировать деструктивные процессы.

ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ՌԵՆՏԳԵՆՅԱՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՀԱՐՄԱՆ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
 ՀԱՎԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԱԾԽԱՋՐԱՏ-ՖՈՍՖՈՐԱՅԻՆ
 ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆԸ ՄԱՍՆԱԿՑՈՂ ՄԻ ՔԱՆԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ
 ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ուսումնասիրված է հավի լյարդի ԱՏՖ-ազայի, գլիկոգենֆոսֆորիլազայի և ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի ակտիվության դինամիկան, օրգանիզմի ճառագայթային ընդհանուր ախտահարման ժամանակ: Ենթադրվում է, որ ԱՏՖ-ազային ակտիվության նվազումը և ֆոսֆորիլազայի ակտիվության աճը ճառագայթային հիվանդության ռեպարատիվ փուլում հանդիսանում է օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման փեղեքման պայմաններում ԱՏՖ-ի պակասը լրացնող կոմպենստոր ռեակցիա:

H. K. PARSADANIAN, A. A. SIMONIAN, L. P. TER-TATEVOSSIAN

THE EFFECT OF TOTAL X-RAY IRRADIATION ON THE ACTIVITY
 OF SOME ENZYMES OF CARBOHYDRATE-PHOSPHOROUS *
 METABOLISM IN CHICKEN TISSUES

The dynamics of ATP-ase, glycogen phosphorylase and phosphoprotein phosphatase activities in chicken heart and liver in the course of total radiation defeat (800 R) has been investigated.

It has been revealed that ATP-ase activity decreases and phosphorylase activity increases on the 3—7th days after irradiation. It is the compensatory reaction of organism, directed to ATP deficit compensation due to uncoupling of oxidative phosphorylation.

The higher radioresistence of the heart muscle phosphoprotein phosphatase, compared with that of the mitochondrial enzyme has been also obtained.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванников Л. Л. В кн.: Радиационное поражение и восстановление структур и функций макромолекул. М., 1977, стр. 210.
2. Гроздов С. П., Кирьянов И. Ю. Радиобиол., 1970, 10, 3, стр. 470.
3. Зотова Р. Н., Уманский С. Р. Радиобиол., 1978, 18, 2, стр. 183.
4. Литовченко И. Н. Автореф. канд. дисс. Одесса, 1973.
5. Парсаданян Г. К., Асланян И. Г., Тер-Татевосян Л. П. Укр. биохим. ж., 1977, 49, 3, 23, стр. 19.
6. Савицкий И. В. В кн.: Проблемы энергетики в облученном организме. М., 1977, стр. 97.
7. Савицкий И. В., Борисова А. С., Зелинский В. Г. и др. Радиобиология, 1967, 7, 6, стр. 840.
8. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.

9. Токарская В. И., Уманский С. Р., Скотникова О. И., Кузин А. И. ДАН СССР, 1972, 227, 4, стр. 998.
10. Уманский С. Р., Зотова Р. Н., Токарская В. И. Радиобиология, 1975, 15, 4, стр. 5.
11. Утешев А. Б., Сатхожина Э. А. В кн.: Вопросы тканевой радиочувствительности. Алма-Ата, 1970, стр. 11.
12. Ashwel G., Hickman J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 80, 407.
13. Cory G. T., Illingworth B., Keller P. In: Methods in Enzymol. N. Y., AP, 1952, 1, 200.
14. Feinstein R. N., Folk M. G. J. Biol. Chem., 1949, 177, 339.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. Y. et al. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
16. Potter R., Bethel F. Federat. Proc., 1952, 11, 270.
17. Taussky H. H., Shorr E. J. Biol. Chem., 1953, 202, 675.