

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АДЕНІЛАТЦИКЛАЗИ, ГУАНІЛАТЦИКЛАЗИ ТА ФОСФОДІЕСТЕРАЗИ ЦИКЛІЧНИХ НУКЛЕОТИДІВ У ТКАНИНАХ СЕЛЕЗІНКИ, ТИМУСУ, ПУХЛИНИ ЩУРІВ ДО І ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ

Досліджено активності аденілатциклази, гуанілатциклази та фосфодіестерази у тканинах селезінки, тимусу, пухлини щурів за умов радіотерапії.

It was studied activities of adenylatcyclase, gyanylatcyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase in spleen, thymus and tumor tissues after irradiation treatment.

Вступ. Вплив факторів оточуючого середовища на організм людей призводить до неухильного зростання кількості онкологічних захворювань. Променева терапія є одним із засобів радикального лікування злоякісних новоутворень, поряд із хірургічним і хіміотерапевтичним лікуванням. Локальний вплив іонізуючої радіації на пухлину в період експотенційного росту обумовлює загибель її клітин за механізмами некрозу й апоптозу. Одночасно променева терапія призводить до появи в організмі додаткових ініціаторів ліпопероксидації. Від цього в тій чи іншій мірі страждають здорові органи й системи організму, знижується їх загальна й протипухлинна резистентність, що полегшує розвиток рецидивів і метастазів пухлини [5].

Дослідження молекулярних механізмів трансдукції сигналів у клітинах різного походження за умов злоякісного росту та променевої терапії для з'ясування їх ролі в цих процесах є актуальним напрямом сучасної науки. Аденілат- та гуанілатциклази, а також фосфодіестерази цГМФ та цАМФ є ключовими ферментами сигнальної системи циклічних нуклеотидів. Відомо, що з порушенням їх функціонування пов'язаний розвиток цілого ряду патологічних процесів [3]. З'ясовано, що променева терапія викликає порушення функціонування системи циклічних нуклеотидів, змінює прийом і переробку клітинами поступаючих до них гормональних сигналів. Проте радіаційно-індуковані порушення функціонування системи циклічних нуклеотидів зумовлені не тільки змінами стаціонарних концентрацій цГМФ і цАМФ, а і змінами активності ферментів, які контролюють їх внутрішньоклітинний рівень: аденілатциклази (АЦ), гуанілатциклази (ГЦ) і фосфодіестерази (ФДЕ) циклічних нуклеотидів.

Метою даної роботи було з'ясування молекулярних механізмів трансдукції сигналів у клітинах різного походження при розвитку карциноми Герена, локальному рентгенівському опроміненні тварин у терапевтичних дозах.

Об'єкт та методи досліджень. В досліді використували білих лабораторних щурів-самців масою 130 ± 10 г, (розведення віварію УНДІОР), яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам трансплантували карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ної суспензії пухлинних клітин на 0,9%-му розчині NaCl, отриманих від щура-донора за методикою [1]. Пухлину на 8-му добу після прищеплення піддавали локальному рентгенівському опроміненню в терапевтичних дозах на апараті РУМ-17 за таких умов: напруга – 180 кВ, сила струму – 10 мА, фільтри – 0,5 мм Cu +1,0 мм Al, потужність дози – 123 Р/хв, шкірно-фокусна відстань – 25 см. Тварин декапітували через 1, 3 та 7 діб після опромінення. Активність ферментів визначали в цитозольній фракції клітин, активність ФДЕ визначали ви-

користовуючи методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol [2]. Активність ГЦ визначали за методом послідовної хроматографії на колонках Al_2O_3 і Dawex, використовуючи рекомендації [4]. Визначення активності АЦ проводили як рекомендовано в роботі [6]. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики.

Результати та їх обговорення. Відомо, що пухлинний процес (трансплантована карцинома Герена щурів) супроводжується незначним зниженням вмісту цАМФ і підвищенням вмісту цГМФ у клітинах селезінки й тимусу, і особливо в пухлині щурів. Локальне опромінення пухлини в дозі 10 Гр призводить до ще більшого зниження цАМФ і підвищення рівню цГМФ у досліджуваних органах. Для з'ясування можливих причин порушень в системі циклічних нуклеотидів нами була визначена активність ферментів аденілат- та гуанілатциклази, а також фосфодіестерази цГМФ та цАМФ у селезінці, тимусі та пухлині щурів у контролі та при локальному опроміненні в дозі 10 Гр (табл.).

В результатах, наведених в таблиці, показано зменшення активності аденілатциклази особливо у селезінці та пухлині порівняно з контролем як при злоякісному рості, так і на фоні опромінення. Активність гуанілатциклази збільшувалась у всі терміни після опромінення: у тимусі її рівень був максимальним на 3 добу (зростання у 2 рази), у пухлині – на 7 добу (зростання в 2,5 рази). У селезінці активність цього ферменту підвищувалась з максимумом на 3 добу після опромінення (в 1,3 рази) порівняно з контролем.

Опромінення впливало неістотно на активність фосфодіестерази цАМФ, із незначними коливаннями в залежності від терміну дії та тканини, що досліджувалась (табл.).

Зміни активності ФДЕ цГМФ як за пухлинного процесу, так і за дії опромінення, були схожими: у селезінці її значення суттєво не відрізнялись від контролю, у тимусі – зменшувалися в усі терміни дослідження, а в пухлині – зменшувалися у 1,5 рази (табл.).

Отримані дані корелюють із змінами рівню циклічних нуклеотидів у досліджуваних органах за умов розвитку пухлинного процесу та опромінення. Можна припустити, що падіння рівню цАМФ у селезінці, тимусі й пухлині щурів є результатом пригнічення активності ферменту їх синтезу – аденілатциклази, а зростання рівня цГМФ – результатом стимуляції гуанілатциклази, що є найбільш вираженим у лімфоїдних органах. Оскільки зміни активності ФДЕ цАМФ та цГМФ за умов опромінення та злоякісного росту були різноспрямованими та статично не значимими, ми припустили, що зміни рівню циклічних нуклеотидів відбувалися в результаті дії АЦ та ГЦ, а не ФДЕ.

Таблиця. Активність аденілатциклази (АЦ), гуанілатциклази (ГЦ) [пмоль/хв·мг білка], фосфодіестераз(ФДЕ) ЦГМФ і цАМФ у тканинах селезінки, тимусу, пухлини щурів до і після опромінення пухлини (М±m; n=3-5)

Орган	Експериментальний стан	АЦ	ГЦ	ФДЕ	
				цАМФ	цГМФ
Селезінка	контроль (інтактні щури)	24,1 ± 3,8	1,6 ± 0,2	334,0 ± 31,6	0,68 ± 0,2
	8 доб. після прищеплення	28,1 ± 2,5	1,8 ± 0,3	240 ± 16,5*	0,4 ± 0,2
	1 доб. після опромінення	12,6 ± 2,1	2,3 ± 0,3*	280 ± 16,4*	0,38 ± 0,2
	3 доб. після опромінення	14,1 ± 3,2	2,2 ± 0,2	260 ± 15,0*	0,42 ± 0,3
	7 доб. після опромінення	21,0 ± 2,3*	1,9 ± 0,4	290 ± 20,5	0,73 ± 0,3
Тимус	контроль (інтактні щури)	8,2 ± 1,2	1,1 ± 0,1	240 ± 25,3	0,73 ± 0,1
	8 доб. після прищеплення	7,5 ± 1,5	1,5 ± 0,2*	220 ± 11,8	0,5 ± 0,1*
	1 доб. після опромінення	6,5 ± 1,8	2,1 ± 0,2*	260 ± 11,8*	0,5 ± 0,2
	3 доб. після опромінення	6,2 ± 2,1	2,4 ± 0,1*	240 ± 11,2*	0,68 ± 0,2
	7 доб. після опромінення	7,5 ± 2,8	1,8 ± 0,5	250 ± 15,1	0,54 ± 0,3
Пухлина	8 доб. після прищеплення	8,4 ± 2,3*	0,98 ± 0,15	220 ± 12,8	0,9 ± 0,2*
	1 доб. після опромінення	6,8 ± 2,1	2,25 ± 0,2*	205 ± 10,1	1,15 ± 0,3
	3 доб. після опромінення	5,8 ± 1,8	2,8 ± 0,2*	295 ± 15,8*	1,1 ± 0,2
	7 доб. після опромінення	5,6 ± 2,1	2,95 ± 0,2	201 ± 10,1*	0,85 ± 0,2

*- p ≤ 0,05 порівняно з контролем.

Отримані нами дані повністю узгоджуються з результатами інших авторів щодо пострадіаційних змін рівнів циклічних нуклеотидів [7].

У цілому ряді попередніх робіт було експериментально показано, що уже в ранній період післяпроменевого ураження змінюється стаціонарний рівень цГМФ і цАМФ, а саме, після впливу іонізуючої радіації відбувається поступове, залежне від часу зниження цАМФ і незначне зростання цГМФ. У подальші терміни досліджень опромінення зменшення вмісту цАМФ прогресувало, а концентрація цГМФ незначно знижувалась, що співвідносилося з [7].

Вивчення процесів, що регулюються системою циклічних нуклеотидів за умов дії іонізуючої радіації, давно привертають увагу дослідників. Показано, що опромінення організму в летальних і надлетальних дозах, а також у дозах радіації, які викликають гостру променеву хворобу, призводило до зниження рівня цАМФ та підвищення концентрації цГМФ у початковий період після дії іонізуючого випромінювання.

Можна припустити, що порушення функціонування систем цГМФ і цАМФ після впливу радіації може бути наслідком структурних і функціональних змін тих ферментів, активність яких контролює і метаболіти, що ми спостерігали при дослідженні пострадіаційних змін активності гуанілат- та аденілатциклазами. Крім цього, подібність характеру виявлених змін в активності цих ферментів може свідчити про однакові механізми ура-

ження каскадів цАМФ та цГМФ внаслідок дії іонізуючого випромінювання на тварин.

Висновки. Таким чином, іонізуюча радіація викликає порушення функціонування системи циклічних нуклеотидів, що може призвести до зміни прийому і переробки клітинами поступаючих до них гормональних сигналів. Радіаційне ураження цієї системи виявляється у зміні стаціонарних концентрацій цГМФ і цАМФ, що є наслідком змін активності ферментів, які контролюють їх внутрішньоклітинний рівень: аденілат- та гуанілатциклази.

1. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Пероксидное окисление и радиация. – К.: Наук. думка, 1991.
2. Лазаревич В.Г., Меньшиков М.Ю., Ткачук В.А. Характеристика двух форм фосфодіестераз циклических нуклеотидов и Ca^{2+} -зависимого белкового регулятора в скелетных мышцах кролика // Биохимия. – 1979. – № 10 – С. 1842-1852.
3. Остапенко Л.И. Роль автофосфорилирования в регуляции активности cAMP-зависимых протеинкиназ из лимфоцитов селезенки крысы в условиях воздействия ионизирующей радиации // Укр. биохим. журн. – 1997. – Т. 69, № 1. – С. 70-74.
4. Nakasawa A., Sano M., Saito T. Subcellular distribution and properties of guanylate cyclase in rat cerebellum // Biochim. et biophys. Acta. – 1976. – V. 444, № 2. – P. 563-570.
5. Suzuki K., Kodama S., Watanabe M. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61, № 14. – P. 5396-5401.
6. White A., Zenser T. Separation of cyclic 3',5'-nucleoside monophosphates from other nucleotides on aluminum oxide columns. Application to the assay of adenylyl cyclase and guanylyl cyclase // Anal. Biochem. – 1974. – V. 41, № 2. – P. 372-396.
7. Van der Maazen K.W., Van der Kogel A.J. Radiosensitivity of rat glial stem cells in vitro // Int. J. Radiat. Biol. – 1990. – Vol. 58, № 6. – P. 1048-1049.

Надійшла до редколегії 26.12.06

УДК 577.125.6

О. Богданова, канд. біол. наук, Л. Кузьменко, асп.
О. Дробінська, канд. біол. наук, Л. Остапенко, д-р біол. наук

УЧАСТЬ СИСТЕМИ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ В РОЗВИТКУ ТА ВІДНОВЛЕННІ СТРЕС-ІНДУКОВАНИХ УРАЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА

Встановлено зростання активності синтази оксиду азоту в клітинах слизової оболонки шлунка за умов розвитку та у процесі відновлення виразок, індукованих стресовим фактором. Більш значне зростання активності фермента було характерне для тварин, яким вводили противиразковий препарат омепразол. У групі тварин, які отримували омепразол, але не підлягали стресу, була встановлена незначна активація синтази оксиду азоту на першу, другу, а також п'яту добу введення препарату.

Increasing of nitric oxide synthase activity in cells of gastric mucosa was established after development and during recovering of lesions induced by stress. In omeprazole treated animals that increase was more potent. Less expressed activation of the enzyme was observed in not stressed animals, treated with the drug.

Вступ. Синтаза оксиду азоту, NO-синтаза, NOS є одним з ключових ферментів регуляції функціональної активності клітин шлунково-кишкового тракту. Існує 3 форми NOS, серед яких дві є малопродуктивними конститутивними (cNOS) і функціонують у фізіологічному

режимі, а третя – індукцибельна макрофагальна (iNOS) активується за різних патологічних станів та продукує на декілька порядків вищий рівень NO. Функціонування конститутивних NOS є умовою компенсування різних незначних відхилень від гомеостазу: так, вазоді-