

в процесі виділення й після розморожування за тривалого зберігання препаратів. Результати визначення

активності препаратів скоротливих білків після розморожування наведено в табл. 1.

Таблиця 1. АТФазна активність актоміозину та міозину серцевого м'яза бика (мкмоль F_n / год·на 1 мг білка) залежно від умов зберігання препаратів ($M \pm m$, $n=7$)

Умови		0,6 моль/л KCl	0,6 моль/л KCl, гліцерол	BW ¹	BW ¹ , гліцерол	Контрольні показники
актоміозин	5 ммоль/л MgCl ₂	1,98 ± 0,05*	3,42 ± 0,12*	4,24 ± 0,15*	5,56 ± 0,19	5,71 ± 0,17
	100 мкмоль/л CaCl ₂ 5 ммоль/л MgCl ₂	2,28 ± 0,06*	4,26 ± 0,14*	4,56 ± 0,14*	5,16 ± 0,19	5,28 ± 0,18
	5 ммоль/л MgCl ₂ 1 ммоль/л ЕГТА	1,14 ± 0,04*	1,59 ± 0,03*	1,86 ± 0,04*	1,93 ± 0,07*	2,46 ± 0,09
міозин	5 ммоль/л CaCl ₂ 50 ммоль/л KCl	8,28 ± 0,36*	31,86 ± 1,17*	41,82 ± 1,64*	49,61 ± 2,03	49,92 ± 1,89
	2,5 ммоль/л MgCl ₂ 50 ммоль/л KCl	0,84 ± 0,02*	1,14 ± 0,02*	1,08 ± 0,02*	2,28 ± 0,04	2,41 ± 0,09
	1 ммоль/л ЕДТА 50 ммоль/л KCl	2,15 ± 0,05*	1,24 ± 0,02*	3,08 ± 0,09	3,09 ± 0,07	3,05 ± 0,08
	5 ммоль/л CaCl ₂ 0,5 моль/л KCl	6,78 ± 0,23*	31,38 ± 1,21*	41,11 ± 1,52*	49,08 ± 1,49	49,52 ± 2,23
	2,5 ммоль/л MgCl ₂ 0,5 моль/л KCl	2,28 ± 0,08*	1,26 ± 0,03*	2,44 ± 0,09*	4,02 ± 0,14	4,14 ± 0,16
	1 ммоль/л ЕДТА 0,5 моль/л KCl	2,88 ± 0,09*	10,08 ± 0,40*	12,06 ± 0,51*	7,56 ± 0,34*	15,18 ± 0,53

Примітка. * – відмінність від контрольних показників достовірна при $p \leq 0,05$; ¹ – склад див. вище.

Показано, що при зберіганні впродовж 3–4 місяців препаратів скоротливих білків АТФазна активність міозину й актоміозину після розморожування була майже в 2 рази меншою при високій концентрації солі, від контрольних показників нижче в середньому на 15–20 % у присутності гліцеролу та 0,6 моль/л KCl, на 10–15 % менше при зберіганні в середовищі BW і майже не змінювалась при додаванні гліцеролу до цього середовища зберігання препаратів скоротливих білків. Препарати актоміозину не втрачають чутливості до Ca^{2+} , що має суттєве значення для дослідження особливостей їхньої регуляції. Подібна зміна АТФазної активності спостерігалась і для міозину: у присутності KCl після розморожування активність значно, на 70–80 %, зменшувалась, при додаванні гліцеролу – на 40 %.

Отже, додавання гліцеролу до середовища, в якому заморожувались препарати скоротливих білків, сприяло

збереженню контрольного рівня їхньої АТФазної активності. За таких умов можливо формується комплекс з активними центрами АТФаз, що викликає тимчасову оборотну блокаду їхньої активності, крім того, гліцерол стабілізує структуру ферментів, захищаючи їх від пошкоджувальної дії солей у високих концентраціях у середовищі заморожування.

Висновки. Можна вважати, що кріозахист препаратів скоротливих білків за допомогою гліцеролу є ефективним.

1. Margossian S.S. // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260, № 25. – P. 13747–13754. 2. Богуща К.І., Цимбалюк О.В., Данилова В.М. // Биополимеры и клетка. – 2002. – Т. 18, № 4. – С. 297–300. 3. Халина Я.Н., Подлубная З.А. // Биофизика. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 367–369.

Надійшла до редколегії 29.09.04

УДК 577.12+616.153.915:616-092.9

І.І. Паталах, канд. біол. наук, М.А. Зеленюк, студ.,
І.В. Лемешко, студ., М.С. Капішнікова, студ.

РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ЕРИТРОПОЕЗУ

Показано, що ініціювання продукції супероксидних радикалів у моделі експериментальної (фенілгідразиної) анемії викликало заміщення пошкоджених еритроцитів новою популяцією клітин. Застосування α -токоферолу пригнічувало накопичення молодих еритроцитів. Обговорюється можлива роль процесів пероксидації у регуляції еритропоезу.

Phenomenon of damaged erythrocytes substitution by new cell population under the phenylhydrazine-induced anemia was found out. α -tocopherol application had suppressed this effect. A possible role of erythropoiesis redox regulation has been discussed.

Вступ. Як відомо, розвиток певних киснедефіцитних станів, таких як гіпоксія та набуті анемії (зокрема, залізодефіцитні чи ятрогенні) призводить до накопичення у крові продуктів одноелектронного відновлення O_2 – активних форм кисню (АФК), що зумовлює часткову дестабілізацію еритроцитарних мембран з наступним прискореним лізісом клітин. Відомо також, що перебіг залізодефіцитних анемії не завжди супроводжується зниженням загальної кількості еритроцитів, оскільки ініціюються механізми еритропоезу й відбувається заміщення зруйнованих еритроцитів новими популяціями клітин. Головна роль у ініціюванні еритропоезу належить гормону еритропоетину (ЕРП), який контролює та

регулює еритроїдну диференціацію колоніє-утворювальних одиниць (КУО) та еритробластів [1]. Але до цього часу залишається відкритим питання щодо адаптивних механізмів, пов'язаних із синтезом еритропоетину. Доведено, що регуляторні послідовності ЕРП-гену перебувають під контролем певних факторів транскрипції [2]. За сучасними даними відомо також, що вторинними месенджерами регуляції активності факторів транскрипції можуть виступати такі АФК, як супероксидний аніон-радикал (O_2^-) і пероксид водню (H_2O_2) [3].

Вважають, що ЕРП-продукуючі клітини печінки й нирок мають O_2 -сенсори [4], які забезпечують чутливість клітин до дефіциту кисню. Проте існують певні дискусії

щодо природи сенсорів: на думку одних авторів – це відповідні мембранні NADPH-оксидази [4], тоді як інші наполягають на мітохондріальній локалізації киснечутливих комплексів (наприклад, сенсорами можуть бути певні ділянки дихального ланцюга) [5]. Концептуально ці дискусії спрямовані на визначення ролі АФК у регуляції еритропоезу. Якщо сенсорами є NADPH-оксидази, тоді функція супероксиду та H_2O_2 , які вони продукують, полягає у гальмуванні синтезу ЕРП [4]. Киснедефіцитні стани є причиною субстратного інгібування NADPH-оксидаз, унаслідок якого знімається гальмування еритропоезу. З іншого боку, доведено, що дефіцит кінцевого акцептора електронів у дихальному ланцюзі й пов'язане з цим продукування АФК стимулюють зв'язування фактора HIF-1 (hypoxia inducible factor) з ДНК та експресію mPHE еритропоетину [5].

Продукція АФК в умовах патогенезу гіпоксичних і анемічних станів також може розглядатись як фактор індукції ЕРП-залежного еритропоезу. Аргументом на користь такої думки може бути виявлення залежності між інтенсивністю утворення ТБК-активних продуктів і виникненням молодих популяцій еритроцитів. Для перевірки цього припущення нами була використана експериментальна модель фенілгідразинової анемії із застосуванням альфа-токоферолу як інгібітора вільнорадикальних процесів.

Об'єкти й методи досліджень. У дослідях використовували білих беспородних щурів масою 150–180 г, яким вводили солянокислий фенілгідразин (ФГ) на фізіологічному розчині в дозі 70 мг/кг маси або фенілгідразин + 30 % альфа-токоферол (ФГ+ТФ) у дозі 0,8 мл/кг маси. Препарати вводили внутрішньочеревними ін'єкціями кожної другої доби протягом двох тижнів.

Популяції еритроцитів виявляли, аналізуючи кислотні еритрограми [6]. Інтенсивність ПОЛ визначали за накопиченням продуктів переокиснення, що тестуються в реакції з тіобарбітуровою кислотою, так званих ТБК-активних продуктів [7]. Активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КАТ) оцінювали за [8], глутатіонпероксидази (ГПО) і глутатіонредуктази (ГР) – за [9]. Визна-

чення ПОЛ і активності ферментів проводили в 1 мл відмитой суспензії еритроцитів.

Результати та їх обговорення. Особливістю фенілгідразинової анемії є гемоліз сформованих еритроцитів з одночасним окисненням гему в структурі гемоглобіну та перетворенням його на метгемоглобін. Саме під час окиснення $HbFe^{2+} \rightarrow HbFe^{3+}$ відбувається додаткова генерація супероксидних радикалів – ініціаторів вільнорадикальних процесів на плазматичних мембранах і в цитозолі еритроцитів (які, як відомо, у зрілому стані втрачають ядро й органели). Наслідком руйнації гемоглобіну є накопичення тілець Гейнца – головного симптому старіння еритроцита. Передчасному старінню сприяють також процеси ПОЛ на мембрані, окиснення тиольних груп білків, які відповідають за транспорт іонів, зміни загального заряду на зовнішній і внутрішній поверхнях плазмалемми та інші деструктивні процеси. Дезорганізація структури плазматичної мембрани внаслідок прямої взаємодії ФГ із карбонільними групами може бути додатковим фактором розвитку ПОЛ. Як наслідок, відбувається лізис еритроцитів у кров'яному руслі або в селезінці. Генералізоване старіння еритроцитів крові підслідних щурів в умовах штучної анемії можна спостерігати на рис. 1, що ілюструється значним зсувом профілю еритрограми вліво відносно профілю контрольної кривої та збільшенням амплітуди максимуму гемолізу.

Проте, водночас з прискореною елімінацією існуючих еритроцитів з'являється популяція молодих клітин, лізис яких починається лише з 10 хв (рис. 1). Частка цих еритроцитів становить близько 20 % від загальної кількості. Подібні дані в умовах ФГ анемії було отримано в роботі [10]. Застосування альфа-токоферолу дещо збільшує час існування еритроцитів в умовах токсичного впливу, але не повертає загальну картину до норми. Надзвичайно важливим, на наш погляд, є факт відсутності другого піку на еритрограмі, яка відображує вплив токоферолу. Це означає зупинку (чи затримку) еритропоезу, ініційованого фенілгідразиним при одночасному застосуванні альфа-токоферолу.

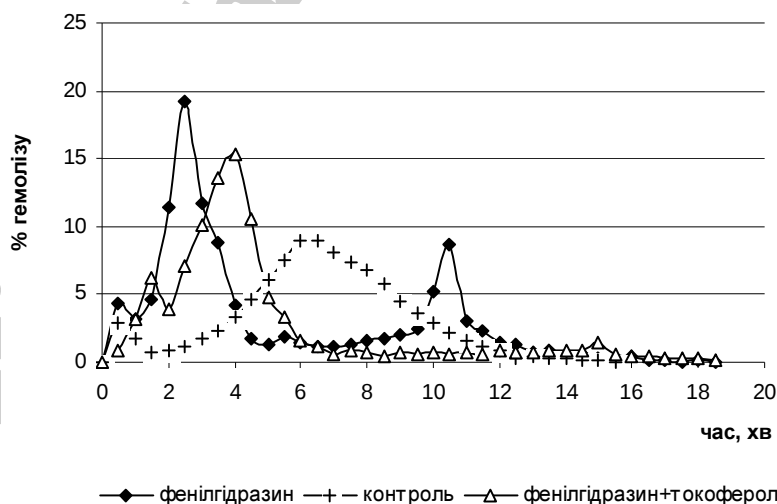


Рис. 1. Кислотний гемоліз еритроцитів крові щурів в умовах експериментальної (фенілгідразинової) анемії та її корекції токоферолом

Намагаючись з'ясувати причини виявлених особливостей дії двох препаратів, які складають пару прооксидант–антиоксидант, було проаналізовано рівень накопичення ТБК-активних продуктів і стан ферментативної системи антиоксидантного захисту в еритроцитах щурів, залучених до експерименту.

Оцінка складових пероксидації ліпідів (рис. 2) показала, що фенілгідразинова інтоксикація достовірно ($p < 0.95$) підвищує лише неферментативну складову ПОЛ. Це свідчить про переважну прооксидантну роль реакції переходу гемоглобіну в метгемоглобін і незначний внесок дезорганізуючого впливу ФГ, який мав би

вивільнити із структури мембрани додаткові центри самоокиснення ліпідів.

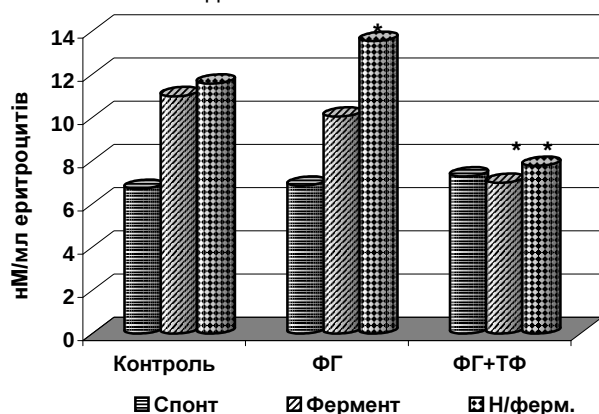


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах щурів після двотижневої періодичної обробки фенілгідазином (ФГ) або фенілгідазином і альфа-токоферолом (ФГ+ТФ).

Застосування альфа-токоферолу призвело до значного інгібування як ферментативної (на 37 % відносно контролю та на 30 % – порівняно з фенілгідазином), так і неферментативної складових (на 33 і 43 % відповідно). Рівень самоіндукованого окиснення при цьому не змінився. Таким чином, можна стверджувати, що під дією токоферолу не лише нівелюється прооксидантний вплив ФГ, але й значно пригнічується загальний рівень ПОЛ еритроцитів у порівнянні з нормою.

Ураховуючи, що альфа-токоферол є поліфункціональним антиоксидантом (може бути прямим інгібітором АФК або ефективним перехоплювачем органічних радикалів, або може потенціювати роботу інших компонентів АО захисту), нами було досліджено реакцію ферментів АО захисту на присутність альфа-токоферолу в умовах фенілгідазинової анемії. Як свідчить діаграма (рис. 3), ФГ викликає значну активацію каталази, глутатіонпероксидази й глутатіонредуктази (на 33,5, 21 і 30 % відповідно). Це узгоджується з добре відомим фактом індукції синтезу ферментативних АО під дією чинників, генеруючих АФК [11]. Але всупереч загальним уявленням про стабільність роботи СОД – першої ланки АО захисту, отримані нами дані свідчать про статистично достовірне ($p < 0,95$) зниження активності СОД в умовах анемії. Дуже показовим є корелюючий вплив токоферолу, який можна охарактеризувати як повернення АО системи до норми шляхом суттєвого зниження активності КАТ, ГПО і ГР та часткового відновлення активності СОД. Аналізуючи зміни ферментативної системи АО захисту в умовах прооксидантно (фенілгідазин) – антиоксидантного (токоферол) втручання, можна впевнено вказати на єдине джерело цих змін – гіперпродукцію супероксидних радикалів. Існують наступні підстави для такого впевненого висновку: 1) надлишок субстрату СОД (O_2) прискорює накопичення продукту (H_2O_2), який у високих концентраціях є інгібітором власного ферменту; 2) про накопичення H_2O_2 свідчить також підвищена активність КАТ і ГПО, для яких він є субстратом. При цьому активність ГР, яка отримує внаслідок роботи ГПР окиснений глутатіон, також підвищується; 3) виявлена здатність токоферолу водночас нормалізувати роботу всієї системи АО захисту може забезпечу-

ватися саме за рахунок знешкодження надлишку супероксидних радикалів – ініціаторів розвитку вільнорадикальних процесів і наступних стресових змін у системі АО захисту.

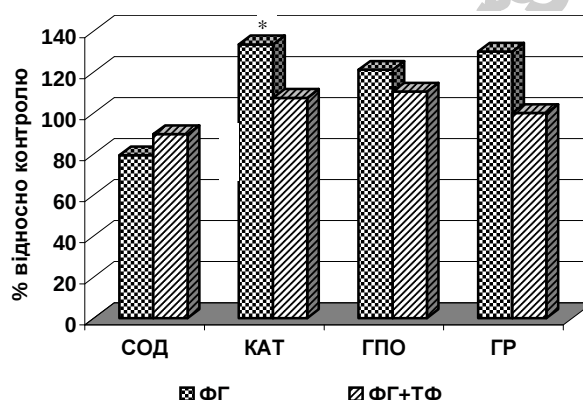


Рис. 3. Активність ферментів АО захисту в еритроцитах щурів в умовах обробки фенілгідазином (ФГ) або фенілгідазином і альфа-токоферолом (ФГ+ТФ).

Висновки. Отримавши додаткові аргументи на користь супероксид-продукуючої ролі фенілгідазину як головної причини його токсичної дії, можемо запропонувати наступний "сценарій" розвитку подій, пов'язаних з ініціюванням стресового еритропоезу. Виходячи в плазму через аніонні канали [12], O_2 у реакціях дисмутації з участю екстрацелюлярної СОД переходить у більш стабільний стан, утворюючи пероксид водню [13]. Саме H_2O_2 як вторинний месенджер стресового сигналу може переноситись плазмою крові до ЕРП-продукуючих клітин та індукувати появу популяції молодих еритроцитів, що було встановлено в нашому експерименті. Непрямим доказом на користь цієї гіпотези може бути зафіксована відміна еритропоезу в присутності альфа-токоферолу – безпосереднього інгібітора АФК. Таким чином, наші дані свідчать на користь активуючої ролі АФК у регуляції еритропоезу.

Автори висловлюють подяку зав. каф. біофізики та біохімії Дніпропетровського НУ д-ру біол. наук Н.І. Штененко за організацію експерименту, в якому відтворювалась модель гемолітичної анемії, та асп. Л.М. Олександровій за технічну допомогу.

1. Жибурт Е.Б., Серебрянная Н.Б. // Terra Medica. – 1997. – № 3. – С. 9.
2. Madan A., Lin C., Hatch S., Curtin P. // Blood. – 1995. – Vol. 85. – P. 2735–2741.
3. Kamata H., Hirata H. // Cell. Signal. – 1999. – Vol. 11, № 1. – P. 1–14.
4. Ермоленко В.М., Иващенко М.А. Уремия и эритропозитин. – М., 1999.
5. Chandel N. S., Maltepe E., Goldwasser E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95 (20). – P. 11715–11720.
6. Гутельзон И.М., Терсков И.А. // Биофизика. – 1957. – Т. 2, № 2. – С. 259–266.
7. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кликун А.А. // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
8. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. // Лаб. дело. – 1991. – Т. 10. – С. 9–13.
9. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переспегина И.А. // Лаб. дело. – 1990. – Т. 8. – С. 19–21.
10. Magakian Iu.A., Karalova E.M., Abroian L.O., Karapetian S.A. // Tsitologia. – 1997. – Vol. 39 (8). – P. 705–710.
11. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Успехи совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 442–455.
12. Дубинина Е.Е. // Укр. биохим. журн. – 1992. – Т. 64, № 2. – С. 3–15.
13. Гамалей И.А., Клубин И.В. // Цитология. – 1996. – Т. 38, № 12. – С. 1233–1247.

Надійшла до редколегії 27.09.04