

Висновки. Результати проведених досліджень свідчать про те, що насичуючими концентраціями субстрату для 5'-нуклеотидазної реакції в гомогенаті тимусу щурів будуть мілімолярні концентрації, якими, як мінімум, є 2 ммоль/л АМФ. Одержані нами дані підтверджені результатами кінетичних досліджень 5'-нуклеотидази печінки ($K_m = 0,136$ моль/л; $V_{max} = 378$ нмоль/хв · мг) та активності даного ферменту тимуса мишей, яку визначали при 5 ммоль/л АМФ. Ураховуючи те, що найвищу активність 5'-нуклеотидази в організмі встановлено саме для печінки, логічним є майже трикрат-

не перевищення значення V_{max} для даного ферменту печінки порівняно з визначеними нами величинами V_{max} дослідження 5'-нуклеотидази для тимусу щурів [4].

1. Schuurman H.J., Laarmoven J.P., Van Broekhuizen R. et al. // Scand. J. Immunol. – 1983. – Vol. 18. – P. 539–549. 2. Якубовский С.М. // Радиобиология. – 1993. – Т. 33, вып. 3 – С. 398–400. 3. Литовченко И.Н. // Радиобиология. – Т. XXIII – Вып. 2. – С. 233–235. 4. Дмитренко Н.М. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – Киев, 1991.

Надійшла до редколегії 10.09.04

УДК 577.113.3

К.О. Дворченко, канд. біол. наук, О.П. Матишевська, д-р біол. наук, А.В. Майданюк, канд. біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ АДЕНІННУКЛЕОТИДІВ, АДЕНОЗИНУ Й АДЕНІНУ В ОПРОМІНЕНИХ ТИМОЦИТАХ ЩУРІВ

Досліджено в динаміці вміст АТФ, АДФ, АМФ, аденозину й аденіну тимоцитів, опромінених у дозі 4,5 Гр. Установлено зниження рівня АТФ, АДФ і зростання рівня аденозину через 1 год після опромінення клітин. Через 3 год зростає вміст АМФ, а вміст АТФ, АДФ та аденозину поступово відновлюється.

Contents of ATP, ADP, AMP, adenosine and adenine of thymocytes, irradiated in a dose 4,5 Gy is investigated in dynamics. Decrease of level of ATP, ADP and increase in a level of adenosine in 1 hour after an irradiation of cells is established. In 3 hours contents of AMP increases, and contents of ATP, ADP and adenosine is gradually restored.

Вступ. Іонізуюча радіація є фактором, що викликає апоптичну загибель клітин шляхом прямої дії на ДНК і опосередковано через утворення активних форм кисню, які викликають розвиток окисного стресу [1, 2]. Важливу роль в ініціації цього процесу відіграє енергетичний стан клітини, зокрема баланс між компонентами аденілової системи. Аденіннуклеотиди виконують важливу роль у проміжному обміні в клітині, утворюючи ланки спряження між процесами, які використовують і генерують енергію. Енергетичний стан клітини визначається стаціонарними концентраціями АТФ, АДФ, АМФ і сумарною концентрацією аденіннуклеотидів [3].

У стаціонарних умовах енергетичного обміну рівновага між АТФ, АДФ і АМФ підтримується за участю низки ферментів синтезу аденілової кислоти з інозиною та її подальшого фосфорилування з утворенням АДФ і АТФ, з одного боку, і ферментами, що здійснюють фосфоролітичний і пірофосфоролітичний гідроліз АТФ і подальше розщеплення АМФ з утворенням аденозину й аденіну, з іншого боку.

Метою даної роботи було дослідити в динаміці енергетичний стан тимоцитів, які піддавались дії рентгенівського опромінення, зокрема вміст аденіннуклеотидів, аденозину та аденіну.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідях використовували щурів лінії Вістар вагою 150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тимоцити одержували шляхом перетирання тимусу через чотири шари нейлонової сітки в буфері для виділення клітин. Опромінення клітинної суспензії здійснювали на установці РУМ-17 за таких умов: експозиційна доза – $11,61 \cdot 10^{-2}$ Кл/кг (4,5 Гр), потужність дози – 0,24 Гр/хв, фільтри 0,5 мм (Cu + Al), напруга 200 кВ, сила струму 10 мА, фокусна відстань – 50 см. Інкубацію клітин ($2-4 \cdot 10^6$ кл/мл) здійснювали в термостаті при 37 °С у середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки. Розділення та кількісне визначення аденіннуклеотидів на силуфолі проводили за методом, описаним у роботі [4, 5]. Пряму денситометрію пластин у відбитому світлі здійснювали на швидкісному сканері денситометра CS-920 "Shimadzu" при довжині хвилі 260 нм. Вміст досліджуваних сполук у хроматографічних плямах визначали за

допомогою калібрувальних кривих залежності площі плями від кількості нанесених хроматографічно чистих препаратів аденіну, аденозину, АМФ, АДФ і АТФ.

Результати та їх обговорення. Після хроматографічного розділення клітинних екстрактів на пластинах Silufol у контрольних тимоцитах вміст АТФ становив $1,30 \pm 0,21$ нмоль/ 10^6 клітин, АДФ – $0,61 \pm 0,05$ нмоль/ 10^6 клітин, АМФ – $0,28 \pm 0,03$ нмоль/ 10^6 клітин, аденозину – $0,11 \pm 0,02$ нмоль/ 10^6 клітин і аденіну – $0,19 \pm 0,03$ нмоль/ 10^6 клітин.

Як видно з рис. 1, уже через 1 год після початку інкубації тимоцитів, які піддавались рентгенівському опроміненню, відбуваються зміни вмісту компонентів аденілової системи порівняно з контрольними клітинами.

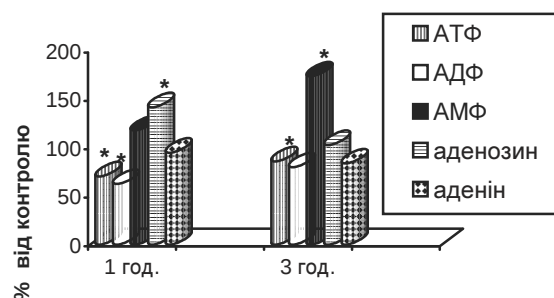


Рис. 1. Зміна вмісту аденілових нуклеотидів, аденозину й аденіну в тимоцитах через 1 і 3 год після рентгенівського опромінення ($p < 0,05$ щодо контролю)

Так, через 1 год після опромінення суспензії тимоцитів рівень АТФ і АДФ знижується відповідно на 30 і 38 % порівняно з контролем. Паралельно з цим вміст АМФ не змінюється порівняно з контролем, але через 3 год його рівень зростає на 74 %. Це вказує на те, що система синтезу АМФ та його попередника – інозилової кислоти після радіаційного впливу не вражається, а має місце порушення оптимального стаціонарного стану системи АТФ-АДФ-АМФ.

Зниження вмісту аденозину на 1-й год інкубації опромінених тимоцитів пов'язане зі зростанням катаболічних реакцій у клітинах у цей період. Відомо, що відновлення вмісту АТФ у інтактних клітинах у випадку

зниження його вмісту забезпечується насамперед посиленням поглинання кисню та підвищенням швидкості дихання для забезпечення окисного фосфорилування АДФ, сигналом для цього є підвищення вмісту АДФ. Як було раніше показано [6], інтенсивність поглинання кисню тимоцитами через 1 год після опромінення зростає, однак рівень АДФ у клітинах у цей термін був зниженим і недостатнім для відновлення вмісту АТФ. Це означає, що процес синтезу АТФ у дихальному ланцюгу порушений унаслідок роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, і через переважання катаболічних процесів у клітинах знижується вміст АТФ і АДФ і накопичується продукт розщеплення АМФ – аденозин.

Однією з причин зниження вмісту АТФ в опроміненних тимоцитах може бути споживання нуклеотиду в поліАДФ-полімеразній реакції, необхідній для репарації ушкоджень ДНК. Проте одночасне зниження вмісту АДФ та виявлене в цей термін посилення поглинання кисню тимоцитами вказують на створення умов для м'якого роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, яке сприяє пригніченню генерації супероксиду в мітохондріях [7].

Аналіз вмісту досліджуваних показників у тимоцитах через 3 год після опромінення вказує на часткове відновлення балансу нуклеотидів та поступове повернення вмісту АТФ і АДФ до контрольного рівня – вміст АТФ і АДФ порівняно з контролем знижений на 14 і 20 % від-

повідно. У цей термін спостерігається також нормалізація вмісту аденозину та зростання вмісту АМФ, а отже, може забезпечуватись зростання рівня АДФ унаслідок перебігу реакції: $\text{АМФ} + \text{АТФ} \rightarrow 2\text{АДФ}$. Така динаміка вмісту компонентів аденолової системи в тимоцитах після опромінення свідчить про те, що виявлені ранні порушення структурно-функціонального стану мітохондрій є тимчасовими або ж розвиваються лише в певній частині клітин у популяції.

Висновки. Виявлене через 1 год після опромінення суспензії тимоцитів зниження вмісту АТФ на фоні зниження АДФ (на 30 і 38 % відносно контролю відповідно) і посилення поглинання кисню клітинами вказує на вірогідність м'якого роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, спрямованого на пригнічення генерації супероксиду в мітохондріях після дії радіації.

1. Cohen-Jonathan E., Bernhard E. J., McKenna W.G. // Current opin. in chemical biol. – 1999. – № 3. – P. 77–83. 2. Blittke T.M., Sandstrom P.A. // Immunol. today. – 1994. – Vol. 15. – P. 7–10. 3. Дмитренко Н.П. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – К., 1991. 4. Майданюк А.В. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2002. – Вип. 36–37. – С. 94–97. 5. Майданюк А.В., Імедадзе С.П. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2004. – Вип. 42–43. – С. 12–13. 6. Дворченко К.О., Миронюк В.І., Яніш Ю.В., Матишевська О.П. // Гигиена населенных мест. 36. науч. пр. – К., 2002. – № 39, Т. 2. – С. 228–233. 7. Скулачев В.П. // Рос. биомед. журн. – 2001. – № 5. – С. 116–126.

Надійшла до редколегії 22.11.03

УДК 577.353

В.В. Гавриленко, магістр, Д.С. Каніболоцький, канд. хім. наук, М.С. Мірошніченко, д-р біол. наук, В.Л. Зима, д-р біол. наук, Т.Л. Давидовська, д-р біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ КОНФОРМАЦІЙНОЇ РУХЛИВОСТІ НЕНАСИЧЕНОГО ІОНОМ КАЛЬЦІЮ ТРОПОНІНУ С СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ

Досліджено конформаційні зміни, що відбуваються у тропоніні С серцевого м'яза курчати при вивільненні іону кальцію з білка в наносекундному інтервалі методом молекулярної динаміки. Порівняльний аналіз отриманих результатів і експериментальних даних рентгеноструктурного аналізу, ядерного магнітного резонансу, флуоресцентної спектроскопії та нейтронного розсіювання показав значну точність і адекватність розрахунків. Показано, що при вивільненні іона Ca^{2+} збільшуються повздовжні розміри тропоніну С, відбувається переорієнтація α -спіралей N-домену та спостерігається тенденція до закривання гідрофобної кишені.

Conformational changes of chicken cardiac troponin C caused by calcium release from protein have been investigated in nanosecond interval using molecular dynamics simulations. Comparative analysis of obtained results and experimental data of X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, fluorescence spectroscopy and neutron scattering has shown adequate accuracy of calculations. It is shown that release of calcium leads to increase of longitudinal size of troponin C, reorientation of α -helices of N-domain and closing of hydrophobic pocket.

Вступ. Скорочення серцевого і скелетного м'язів регулюється спеціальним білковим тропонін-тропоміозиновим комплексом, який розташований на актиновому філаменті. Було встановлено, що тропонін складається з трьох субодиниць, кожна з яких виконує свої специфічні функції. Тропонін С (ТНС) відповідає за Ca^{2+} -залежну регуляцію м'язового скорочення, тропонін І інгібує АТФазну активність актомиозину і тропонін Т забезпечує прикріплення тропоніну до тропоміозину [1]. Детальний механізм роботи тропоніну С поки що достовірно не відомий.

Відомо, що мутації в генах, які кодують білки тропонінового комплексу, можуть спричиняти гіпертрофічну або розширену кардіоміопатію. Протягом останнього десятиріччя було з'ясовано важливість генетичних дефектів, що успадковуються, у патогенезі кардіоміопатій [2]. Уточнення ролі цих генів у функціях серцевого м'яза та шляхів, якими мутації в цих генах ведуть до гіпертрофії або дисфункції скорочення в різних фізіологічних умовах, є дуже важливою проблемою медицини та фундаментальної науки. Для розуміння причин виникнення хвороби необхідно докладно з'ясувати механізм регуляції скорочення міокарда на молекулярному рівні

з використанням чутливих експериментальних і теоретичних методів, зокрема методу молекулярної динаміки білків. Тропонін С серцевого м'яза (сТНС) є потенційним об'єктом для лікування хворих з гострим інфарктом міокарду та наступною серцевою недостатністю, коли хворий міокард не відчуває підвищення концентрації цитозольного кальцію [3, 4].

Тропонін С – білок масою 18 кДа, який регулює скорочення міокарду шляхом зв'язування іонів Ca^{2+} . Тропонін С має від 159 до 162 амінокислотних залишків. Якщо відсутні зв'язані іони кальцію, одна молекула тропоніну С має заряд -29 [1]. Пари α -спіралей А і В, С і D, Е і F, G і H формують центри зв'язування іонів кальцію відповідно перший, другий, третій, четвертий (рис. 1, а).

Молекула сТНС складається з двох глобулярних доменів (N і C), з'єднаних між собою центральною α -спіраллю. N-кінцевий домен ТНС (амінокислотні залишки 1–85 [3]) містить два центри зв'язування іонів кальцію. Перший центр сТНС інактивований унаслідок мутації, тому він не зв'язує ці катіони на відміну від ТНС скелетного м'яза. С-кінцевий домен ТНС (амінокислотні залишки 95–161) має два активні Ca^{2+} -зв'язувальні центри.