

що при вільнорадикальному окисненні відбувається міграція подвійних зв'язків у переважній більшості полієнових ацилів. Разом з тим, процес пероксидного окиснення з утворенням гідропероксидів може проходити й без зміни локалізації подвійних зв'язків. Таким чином, пероксидне окиснення може відбуватися і без збільшення вмісту ДК.

Розпад гідропероксидів, незалежно від механізму утворення, супроводжується утворенням вторинних продуктів ПОЛ типу МДА, які визначали в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою – ТБК-активні продукти. Саме за вмістом ТБК-активних продуктів в АМ ентеро-

цитів слизовій оболонці тонкої кишки й оцінювали кількість МДА. Аналіз проведених досліджень свідчить (табл. 1), що загальний вміст МДА збільшується після дії іонізуючої радіації в дозах 1,0; 2,0; 3,0 та 6,0 Гр у середньому на 31, 50, 56 і 69 % відповідно. За рахунок зменшення мікрів'язкості мембран може відбуватися Fe^{2+} -аскорбатзалежне підвищення рівня МДА [9]. Дійсно, у препаратах АМ, отриманих із тварин після опромінення в дозах 1,0; 2,0; 3,0 і 6,0 Гр, вміст МДА підвищується в середньому на 22, 32, 41 і 64 % відповідно.

Таблиця 1. Вміст продуктів ПОЛ в апікальній мембрані ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки щурів після дії іонізуючої радіації, ($M \pm m$, $n = 7$)

Умови досліджу		Дієнові кон'югати, (A_{233}/A_{218})	Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка		Шиффові основи, відн. од.
			-Fe-аскорбат	+Fe-аскорбат	
контроль		$0,92 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,01$	$2,23 \pm 0,21$	1,0
Доза, Гр	0,1	$0,90 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,02$	$2,31 \pm 0,20$	$1,05 \pm 0,04$
	0,4	$0,88 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,03$	$2,52 \pm 0,23$	$1,08 \pm 0,04$
	1,0	$0,85 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,02^*$	$2,74 \pm 0,24^*$	$1,10 \pm 0,03$
	2,0	$0,82 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,03^*$	$2,90 \pm 0,27^*$	$1,13 \pm 0,04$
	3,0	$0,80 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,02^*$	$3,12 \pm 0,30^*$	$1,15 \pm 0,04$
	6,0	$0,76 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,03^*$	$3,65 \pm 0,34^*$	$1,17 \pm 0,05$

* $P \leq 0,05$ відносно контролю

Кінцевим продуктом ПОЛ є утворення ШО внаслідок взаємодії вторинних продуктів ПОЛ з фосфоліпідами та білками, які містять вільні аміногрупи. Оцінку вмісту ШО в АМ ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки проводили за визначенням інтенсивності їхньої флуоресценції. Аналіз результатів дослідження свідчить про те, що за умов досліджень спостерігається незначне збільшення вмісту ШО. Лише після дії іонізуючої радіації в дозі 6,0 Гр вміст ШО підвищується в середньому на 17 %. Це може призводити до змін білок-ліпідних взаємодій і заміни їх на білок-білкові, що сприяє агрегації молекул білка.

Захист ліпідів мембран від надмірного накопичення продуктів ПОЛ виконує антиокиснювальна система. Інтегральною характеристикою функціонування цієї системи є її загальна антиокиснювальна активність, яку для АМ оцінювали за величиною константи інгібування окиснення 2,6-дихлорфеноліндофенолу натрію у присутності препаратів АМ. Установлено, що константа швидкості окиснення суттєво не змінюється після дії досліджуваних доз, спостерігається лише тенденція до її збільшення. У той же час константа інгібування окис-

нення вірогідно збільшується лише після іонізуючої радіації в дозі 3,0 і 6,0 Гр у середньому на 15 і 19 % відповідно.

Висновки. Отримані результати свідчать, що в мембранах ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки за дії іонізуючої радіації відбувається зрушення у функціональній активності окисдантно-антиоксидантної системи, причиною чого може бути модифікація окремих її ланок, що потребує подальшого дослідження.

1. Барабой В.А. Перекисное окисление липидов и радиация. – К.: Наукова думка, 1991.
2. Stange E.F., Preclik G., Schneider A. et al. // Biochim. et biophys. acta. – 1981. – Vol. 663, № 3. – P. 613 – 620.
3. Степанов Ю.В., Степанова Л.Л., Войцїцький В.М., Кучеренко М.Е. // Український біохімічний журнал. – 1999. – Т. 71, № 1. – С. 48–52.
4. Цвилюховський Н.И., Усатюк Г.В., Мельничук Д.А. // Укр. биохим. журнал. – 1988. – Т. 60, № 6. – С. 91–94.
5. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. – М., 1977.
6. Куклей М.П., Стволинский С.П., Шаврацкий В.Х., Шатрова Ю.В. // Нейрохимия. – 1995. – Т. 12, № 2. – С. 28–35.
7. Семенов В.А., Ярош А.М. // Укр. биохим. журнал. – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50–52.
8. Владимиров Ю.А. // Биофизика. – 1987. – Т. 32, вып.5. – С. 830–841.
9. Stange E.F., Preclik G., Schneider A. et al. // Biochim. et biophys. acta. – 1981. – Vol. 663, № 3. – P. 613 – 620.

Надійшла до редколегії 10.09.04.

УДК.577.346:616.438

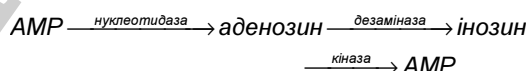
С.П. Імедадзе, провід. інж., А.В. Майданюк, канд. біол. наук,
І.К. Кисельова, інж.

ВИЗНАЧЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ 5'-НУКЛЕОТИДАЗНОЇ РЕАКЦІЇ ТИМУСА ЩУРІВ

Визначено кінетичні показники (K_m , V_{max}) 5'-нуклеотидази гомогенату тимусу щурів.

The kinetic parameters (K_m , V_{max}) of 5'-nucleotidase of rat thymus homogenate are estimated.

На мембранозв'язані ферменти впливає стан ліпідного матриксу, передусім в'язкість ліпідного компоненту мембрани й концентрація продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів. Одним з таких ферментів є 5'-нуклеотидаза (К.Ф. 3.1.3.5; 5'-рибонуклеотидфосфогідролаза). Це ліпідзалежний фермент плазматичної мембрани клітин, каталітична активність якого полягає в гідролізі АМР з утворенням аденозину.



Особливе значення 5'-нуклеотидази пов'язане з пригніченням пуринового метаболізму при імунodefіцїтних станах. Недостатність 5'-нуклеотидази тимусу та інших лімфоїдних органів супроводжується значним зниженням аденозину, що викликає порушення функцій Т- і В-лімфоцитів. У зв'язку з тим, що зміну концентрації аденозину розглядають як регуляторний фактор для багатьох важливих фізіологічних процесів (ліполіз, регуляція кровотоку та ін.), функціональний стан 5'-нуклеотидази та його регуляція зумовлюють значний інтерес до вивчення цього ферменту.

© С.П. Імедадзе, А.В. Майданюк, І.К.Кисельова, 2005

На даний час накопичені численні факти про те, що фізіологічні процеси пов'язані із загибеллю одних і пошкодженням інших типів клітин. Характер загибелі клітин за стереотипним механізмом некрозу або апоптозу визначається рівнем внутрішньої організації та метаболізму ядерних клітин.

Запрограмована смерть включає в себе визначену послідовність змін у активності ферментів, яка контролюється на рівні збільшеного *de novo* синтезу білка.

Було з'ясовано, що на останній стадії розвитку кортикальних тимоцитів різке зниження рівня термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази за малої активності пуриннуклеозидфосфорилази й 5'-нуклеотидази та високої – аденозидеаминази призводить до виникнення в клітинах токсичної концентрації пуриндезоксинуклеотидів. Вважають, що саме таке співвідношення ферментів є летальним для клітин тимусу. Метаболічні шляхи, які протидіють накопиченню аденозинових нуклеозидів, каталізуються аденозидеаминазою, збільшенню концентрації гуанозинових нуклеозидів – пуриннуклеотидфосфорилазою. Якщо активність аденозидеаминази в кортикальних тимоцитах достатньо висока й лише на останніх стадіях розвитку знижується, то рівень пуриннуклеотидфосфорилази в кортикальних тимоцитах низький і збільшується лише у разі їхнього перетворення в медулярні Т-клітини. Клітини можуть уникнути загибелі від отруєння метаболітами дезоксигуанозину за умови підвищення активності пуриннуклеотидфосфорилази, що відбувається при переході їх на наступну стадію диференціювання [1].

Аналіз наведених даних свідчить про те, що дослідження 5'-нуклеотидазної активності є актуальним питанням при дослідженні біохімічних механізмів апоптозу. Проте аналіз літературних даних з дослідження активності 5'-нуклеотидази виявив, що різні дослідники при визначенні активності використовували різні концентрації субстрату, при цьому різниця коливається від мікромолярних до мілімолярних. Усе це змусило нас провести кінетичні дослідження 5'-нуклеотидазної активності у фракції "грубих" плазматичних мембран тимуса щурів.

Об'єкт і матеріали досліджень. У досліджах використовували білих нелінійних щурів масою 150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Гомогенат тимусу центрифугували при 3000 об/хв центрифуга K23D (Німеччина). Супернатант (фракція "грубих" плазматичних мембран) використовували в подальших до-

слідах. 5'-нуклеотидазну активність отриманих препаратів гомогенату тимусу визначали за кількістю неорганічного фосфату, який утворювався в результаті ферментативної реакції в інкубаційному середовищі, до складу якого входили 2 ммоль/л AMP, 2 ммоль/л $MgCl_2$, 10 ммоль/л трис- HCl рН 8,8. Після інкубації на протязі 5–45 хв при 37 °C реакцію зупиняли додаванням 30 % ТХО. Осад відцентрифугувували при 6000 g упродовж 10 хв. Неорганічний фосфат визначали в супернатанті модифікованим методом Чена. Для цього до 200 мкл супернатанту додавали 800 мкл $dist H_2O$, потім додавали 1 мл розчину хромогенної суміші. Для розвитку забарвлення проби інкубували протягом 45 хв при t 37 °C, після чого проводили спектрофотометричний аналіз проб при довжині хвилі 750 нм. Результати статистично обробляли за стандартними методами.

Результати та їх обговорення. При аналізі наведених у літературі прикладів визначення активності 5'-нуклеотидази одних і тих самих тканин ми звернули увагу на значну розбіжність (у межах від мікромолярних до мілімолярних) концентрацій AMP, які використовували різні дослідники [2, 3]. Саме цей факт змусив нас провести експериментальні дослідження залежності утворення продукту 5'-нуклеотидазної в часі за різних концентрацій субстрату.

Результати цих досліджень (табл. 1) дозволяють зробити висновок про прямопропорційну залежність утворення продукту до 30 хв інкубації спостерігається при концентрації білка 50 мкг на пробу, і до 15 хв – при концентрації 100 мкг на пробу. За більш високих концентрацій білка ця залежність порушується. Тому для подальших досліджень залежності утворення продукту 5'-нуклеотидазної реакції в часі за різних концентрацій субстрату використовували концентрацію білка 50 мкг на пробу, що гарантувало лінійність утворення продукту в часі та можливість визначення початкової швидкості (V_{max}) за наведених концентрацій субстрату. Графічне зображення залежності початкової швидкості від концентрації субстрату дало можливість зробити висновок про гіперболічний характер цієї залежності, тобто кінетика 5'-нуклеотидазної реакції тимусу щурів підлягає кінетиці Міхаеліса – Ментен. Подання цієї залежності в подвійних обернених одиницях $1/V$ від $1/S$ (метод Лайнуверера – Берка) дало змогу обчислити значення максимальної швидкості (V_{max}) і константи Міхаеліса (K_m) для даної ферментативної реакції.

Таблиця 1. Параметри 5'-нуклеотидазної реакції

I. Залежність утворення Р* 5'-нуклеотидазної реакції за різних концентрацій білка, нмоль Р _n (конц. AMP 2ммоль/л)					
Час інкубації	5'	15'	30'	45'	
50 конц. 0-ка(мкг)	22,5 ± 0,6	68,3 ± 1,3	132,5 ± 1,5	146,5 ± 0,9	
100	42,3 ± 0,7	126,3 ± 1,1	197,8 ± 1,2	245,3 ± 0,7	
200	83,7 ± 0,4	187,9 ± 1,4	232,3 ± 1,3	258,7 ± 0,9	
400	390,1 ± 0,5	351,4 ± 1,3	293,9 ± 1,5	274,4 ± 0,6	
II. Залежність утворення Р* 5'-нуклеотидази в часі за різних концентрацій субстрату нмоль Р _n (50 мкг білка)					
Час інкубації	5'	15'	30'	45'	
0,125 ммоль/л ^{конц. AMP}	11,8 ± 0,4	35,4 ± 1,4	29,0 ± 1,5	26,2 ± 0,9	
0,250 ммоль/л	21,5 ± 0,6	64,5 ± 1,3	61,2 ± 1,2	45,1 ± 0,8	
0,5 — " —	22,5 ± 0,5	67,5 ± 1,2	84,6 ± 1,4	119,3 ± 1,0	
1 — " —	24,7 ± 0,4	74,2 ± 1,4	125,8 ± 1,3	165,6 ± 0,8	
2 — " —	23,6 ± 0,6	70,9 м 1,3	135,4 ± 1,5	148,3 ± 0,9	
III. Залежність початкової швидкості (V ₀) від концентрації субстрату АРМ _{нмоль} хв х мф					
Конц. AMP ммоль/л	0,125	0,250	0,5	1	2
V ₀	46,6 ± 1,5	85,4 ± 1,3	89,4 ± 1,4	98,6 ± 1,5	93,4 ± 1,3
IV. Значення кінетичних констант 5'-нуклеотидазної реакції					
K _m			V _{max}		
0,2 ммоль/л			125 нмоль/хв · мф		

Примітка: Р*– продукт 5'-нуклеотидазної реакції = (Р_n)

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. Дворщенко, 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.

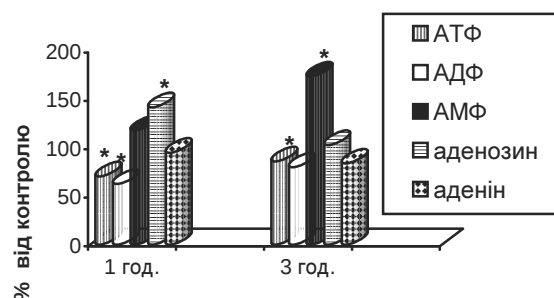


Рис. 1. Зміна вмісту аденілових нуклеотидів, аденозину й аденіну в тимоцитах через 1 і 3 год після рентгенівського опромінення ($p < 0,05$ щодо контролю)

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