

ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ
РЕНТГЕНІВСЬКОГО ВИПРОМІНЮВАННЯЯ. Г. Іванушко¹, Ю. П. Гриневиц², Г. М. Чоботько³¹ Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича, Чернівці² Інститут ядерних досліджень НАН України, Київ³ Інститут експериментальної радіології НЦРМ АМН України, Київ

Досліджували вплив 30-добового фракціонованого рентгенівського випромінювання в сумарних дозах 0,3, 0,6, 0,9 та 1,2 Гр на окиснювальну модифікацію білків печінки щурів, яку оцінювали за рівнем альдегідо- та кетопохідних динітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру. Рентгенівське випромінювання викликало збільшення продуктів окиснювальної модифікації білків як нейтрального, так і основного характеру по закінченні опромінення в усіх дозах через 1 та 10 діб, при цьому вищим був рівень альдегідо- та кетопохідних основного характеру. Через 20 і 30 діб показники окиснювальної модифікації білків наближались до значень контролю. Підвищений рівень окисномодифікованих білків спостерігався до 30 діб по закінченні опромінення.

Вступ

Печінка в організмі людини і тварин виконує важливі численні функції, спрямовані на підтримання гомеостазу. До них належать участь печінки у всіх видах обміну речовин, захисна функція (дезінтоксикація ксенобіотиків), депонування крові й підтримка тону судин, участь у процесах кровотворення (депо заліза та ціанокобаламіну, синтез компонентів системи згортання крові та фібринолізу). В умовах стресу функціональна активність печінки підвищується. Іонізуюче випромінювання в малих дозах деструктивно впливає на структурно-функціональну впорядкованість живих систем [1, 2]. Різноманітні метаболічні чинники, що надходять від інших органів, у тому числі й радіочутливих, активізують ряд метаболічних процесів у печінці, що можуть мати значення у формуванні віддалених наслідків дії малих доз радіації [3].

Однією з ранніх форм відповіді організму на дію стресових факторів є підсилення процесів біодеградації [4]. Особливої уваги заслуговують механізми деградації білкових молекул та зміни в структурі білків, які є їх передумовою завдяки надзвичайно важливому їх значенні для повноцінної життєдіяльності організму. Особлива роль в обміні клітинних білків належить активним формам кисню, які модифікують їх і роблять більш чутливими до дії протеолітичних ферментів [5].

Активні форми кисню (АФК) присутні в біологічних системах будь-якого рівня організації. Вони утворюються внаслідок функціонування електрон-транспортних ланцюгів мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму, ферментативних оксигеназних реакцій, які каталізуються циклооксигеназами, ліпоксигеназами, ксантиоксидазою та іншими ферментами [6]. Ці активні молекули беруть участь в обміні білків, ліпідів, вуглеводів, нуклеїнових кислот, у синтезі простагландинів, лейкотрієнів, тромбоксанів, у регуляції проникності клітинної мембрани, у механізмі фагоцитозу [7]. Саме тому постійно має місце оксидація білків, яка може підсилюватись дією несприятливих факторів. Рентгенівське випромінювання сприяє активації генерації АФК [8]. Нині нарамаджено численні дані, що стосуються механізму пероксидного окиснення ліпідів клітинних мембран, його ролі в діяльності клітини за умов фізіологічної норми, у патогенезі різноманітних захворювань, у тому числі й іонізуючого випромінювання. За останні роки зросла кількість наукової інформації про те, що АФК викликають окиснювальну модифікацію не тільки ліпідів, але й білків і нуклеїнових кислот. Механізми окиснювальної модифікації білків (ОМБ), що мають місце в органах і тканинах при окиснювальному стресі вивчались, як правило, в умовах разового опромінення у великих дозах. Дослідження, що стосуються динамічних змін ОМБ у післярадіаційному періоді фракціонованого опромінення в малих дозах, практично відсутні. Хоча вони становлять найбільший інтерес для клінічних радіологів.

Метою роботи було з'ясувати пролонгований ефект фракціонованого рентгенівського випромінювання в різних дозах на окиснювальну модифікацію білків печінки щурів у динаміці після опромінення.

Матеріали та методи

Досліди проводились на 160 нелінійних білих щурах-самцях масою 120 - 150 г. Фракціоноване тотальне опромінення тварин рентгенівськими променями здійснювали щоденно впродовж 30 діб з інтервалом 24 год на рентгенівській діагностичній установці 12 Пб за умов: потужність дози 0,258 мКл/с; напруга 90 кВ; сила струму 40 мА при алюмінієвому фільтрі та шкірно-фокусній відстані 48 см. Щоденні дози становили 1, 2, 3 і 4 сГр (0,258, 0,516, 0,774 і 1,032 мКл/кг) відповідно. Сумарні дози були 0,3 Гр (група 1), 0,6 Гр (група 2), 0,9 Гр (група 3) та 1,2 Гр (група 4) відповідно. Тварин декапітували через добу та на 10-ту, 20-ту і 30-ту доби по закінченні курсу опромінення. Ступінь ОМБ оцінювали за рівнем альдегідо- та кетопохідних динітрофенілгідразонів нейтрального (АКДНФГ НХ) (E_{370} нм) та основного (АКДНФГ ОХ) (E_{430} нм) характеру [9] в гомогенаті печінки. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм із використанням критерію Ст'юдента.

Результати та обговорення

Тотальне рентгенівське опромінення викликає зростання АКДНФГ НХ та АКДНФГ ОХ, що залежить від дози, більш виражене в 4-й групі тварин (рис. 1 і 2), сумарна доза опромінення яких була 1,2 Гр. Окиснювально модифіковані білки є субстратами для внутрішньоклітинних протеаз. Більшість модифікованих білків зазнають протеолітичного розпаду в 50 разів швидше, ніж незмінені білки. У свою чергу протеази проявляють селективність до цих білків [10, 11]. Рівень модифікованих білків відображає стан рівноваги між рівнем окиснених білків і швидкістю їх розпаду. Накопичення продуктів ОМБ є складовою багатьох факторів, що керують синтезом та окисненням білків, з одного боку, та активністю різних протеаз, з іншого. Через 10 діб рівень продуктів окиснювальної модифікації білків зростав у 2-й, 3-й і 4-й групах (див. рис. 1). Через 20 діб рівень продуктів ОМБ знижувався: в 1-й і 2-й дослідних групах він залишався на рівні або вище контрольних значень, а в 3-й і 4-й дослідних групах був меншим від контрольних показників (77 та 73 % у 3-й; 84 та 78 % у 4-й) (див. рис. 1 і 2). Через 30 діб по закінченні курсу опромінення відмічався підвищений рівень досліджуваних ОМБ (майже однаковий) у 1-й, 2-й і 3-й дослідних групах. У 4-й дослідній групі показники наближались до контрольних значень. Тобто для трьох груп тварин (2, 3, і 4) із сумарною дозою опромінення 0,3, 0,6 і 1,2 Гр спостерігається екстремальний характер зростання рівня альдегідо- та кетопохідних основного й нейтрального характеру, з досягненням максимальних значень на 10-ту добу від завершення опромінення, з наближенням до значень контролю на 20-ту добу. У подальшому (30-та доба) рівень альдегідо- та кетопохідних не зазнає суттєвих змін. Тобто відновлення ОМБ починається вже через 20 діб по завершенню радіаційного впливу. Інший характер змін рівня альдегідо- та кетопохідних основного й нейтрального характеру виявлено в групі тварин із найменшою сумарною дозою (0,3 Гр) опромінення, максимальні значення яких реєструються на 1-шу добу з подальшим зменшенням до 20-ї доби.

По закінченні курсу опромінення спостерігалось зростання рівня АКДНФГ ОХ через 1 і 10 діб (див. рис. 2). Через 20 і 30 діб вищі показники спостерігались для АКДНФГ НХ (див. рис. 1). Різниця між приростом похідних нейтрального й основного характеру узгоджується з даними літератури відносно різної чутливості амінокислот до дії активних форм кисню. Проведені експерименти [7, 11] свідчать про участь різних форм кисню в процесах ОМБ, проте вважають, що безпосереднім модифікуючим агентом є гідроксильний радикал, до якого чутливі майже всі амінокислотні залишки. За величиною ушкоджень їх можна розташувати таким чином: гістидин (основна амінокислота) > цистеїн > триптофан > тирозин – інші [7, 11]. Крім того, рівень карбонільних груп має відмінність для різних білків: протеїни з низькою молекулярною масою більшою мірою піддаються окисдації й демонструють більший приріст

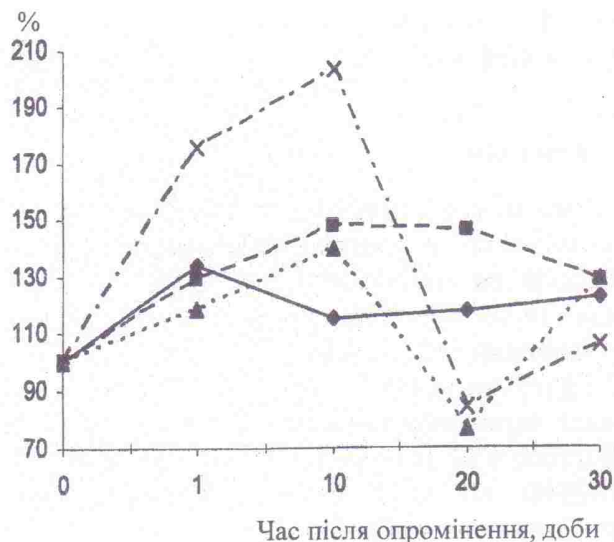


Рис. 1. Динаміка рівня альдегідо- та кетопохідних динітрофенілгідрозонів нейтрального характеру в печінці щурів за дії фракціонованого рентгенівського випромінювання в дозах 0,3, 0,6, 0,9 та 1,2 Гр (групи 1, 2, 3 і 4 відповідно) (% до контролю).

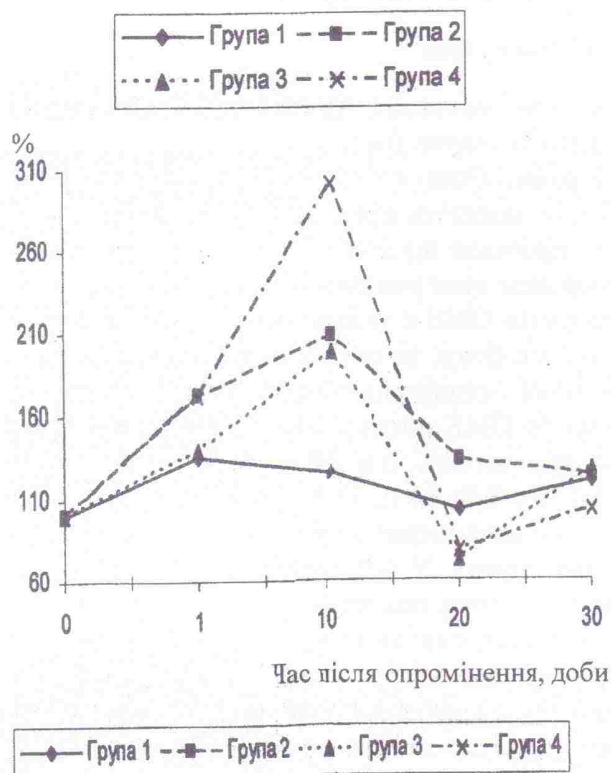


Рис. 2. Динаміка рівня альдегідо- та кетопохідних динітрофенілгідрозонів основного характеру в печінці щурів за дії фракціонованого рентгенівського випромінювання в дозах 0,3, 0,6, 0,9 та 1,2 Гр (групи 1, 2, 3 і 4 відповідно) (% до контролю).

їх продуктів, ніж високомолекулярні білки [12]. Підвищений рівень протеолізу низькомолекулярних білків (альбуміні) за дії рентгенівського випромінювання був показаний нами в попередніх дослідженнях [1]. Зміни рівнів продуктів ОМБ за використаних нами доз опромінення в динаміці мають певну відмінність. У 1-й групі з найменшою сумарною дозою опромінення максимальний рівень продуктів ОМБ спостерігався через добу по закінченні курсу опромінення, з подальшим монотонним його зниженням до контрольних показників через 20 діб і з наступним незначним зростанням на 30-ту добу. У 2-й, 3-й і 4-й групах максимальний рівень продуктів ОМБ спостерігався через 10 діб і досягав мінімальних значень на 20-ту добу, що практично є відрізнялись від контрольних. У 2-й групі, починаючи з 10-ї доби і до 30-ї, рівень ОМБ практично не змінювався. На 30-ту добу підвищений рівень ОМБ був характерним для тварин 3-ї і 4-ї груп.

Відомо, що серед білків найбільш чутливими до окисдаивних ушкоджень є ферменти, особливо ті, що містять іони металів [7, 14]. Деякі з внутрішньоклітинних протеаз, що селективно деградують модифіковані білки, теж інактивуються реакційно-здатними формами кисню, що може бути причиною зменшення темпів деградації й призводити до накопичення в клітинах модифікованих білків [15], як це має місце в наших дослідженнях [13]. На цей процес може також впливати функціональний стан системи антиоксидантного та антирадикального захисту, основні компоненти якого (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіон пероксидаза) зазнають значних коливальних змін за тотального фракціонованого рентгенівського опромінення [16], що може робити білки більш чутливими до окиснювальної модифікації. Це має значення для нормального забезпечення повноцінної функціональної активності організму, який зазнає тривалого радіаційного впливу.

Таким чином, рентгенівське випромінювання викликає зміни вмісту продуктів ОМБ у печінці щурів у різні терміни по закінченні курсів опромінення залежно від застосованої дози, що вказує на залежність цієї ланки обміну від порушень, викликаних тривалим радіаційним впливом у малих дозах у відносно резистентній тканині печінки. Звертає на себе увагу різниця між приростом похідних нейтрального та основного характеру. Підвищений рівень модифікованих білків спостерігався до 30-ї доби по закінченні курсів опромінення. Акумуляція оксидативно модифікованих протеїнів може бути ранньою ознакою ушкодження тканин, опосередкованого активними формами кисню (а тим самим й інтенсифікацією процесів перекисного окиснення ліпідів), а утворення білкових карбонільних дериватів асоціюється з патологічними станами організмів як людей, так і тварин [14, 15]. Дослідження процесів ОМБ свідчить про їх високу чутливість до тривалої дії іонізуючого випромінювання. Коливальний характер цих змін дає змогу припустити, що організм здатний переключати білковий обмін у напрямі відновних процесів, що вказує на можливість та доцільність застосування корегуючих впливів для нормалізації обмінних процесів білків за умов дії різних чинників, зокрема іонізуючих випромінювань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Серкиз Я.И., Пинчук В.Г., Пинчук Л.Б. и др. Радиобиологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС. - К.: Наук. думка, 1992. - 172 с.
2. Чернобыльская катастрофа / Під ред. В. Г. Бар'яхтара. - К.: Наук. думка, 1996. - 575 с.
3. Горчакова Л.А. Відгук мітохондрій печінки на малу та велику дози зовнішнього іонізуючого опромінення // Діагностика та профілактика негативних наслідків радіації: Матеріали симп., Київ, 16 - 17 груд. 1997 р. - Київ, 1997. - С. 81 - 83.
4. Блехман Г.И., Шеламова Н.А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Успехи современной биологии. - 1992. - Т. 112, вып. 2. - С. 281 - 297.
5. Davies K.J., Delsignore M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol. 262, No. 20. - P. 9908 - 9913.
6. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. - 1998. - № 7. - С. 43 - 51.
7. Арчаков А.И., Мохосоев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия. - 1989. - Т. 54, вып. 2. - С. 179 - 186.
8. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Под ред. Ю.А. Зозули - К.: Наук. думка, 1997. - 420 с.
9. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы мед. химии, - 1995. - Т. 45, № 1. - С. 24 - 26.
10. Меццишен І.Ф., Польовий В.П. Механізми окислювальної модифікації білків // Буковинський медичний вісник. - 1999. - Т. 3, № 1. - С. 196 - 206.
11. Davies K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol. 262, No. 20. - P. 9902 - 9907.
12. Schild L., Reinheckel Th., Wiswedel In., Augustin W. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia reoxygenation: involvement of oxidative protein modification // Biochem. J. - 1997. - No. 328. - P. 205 - 210.

13. *Іванушко Я.Г., Гриневич Ю.П.* Вплив лазерного випромінення на післярадіаційний стан фібринолізу та протеолізу печінки щурів // Зб. наук. праць Ін-ту ядерних досл. - 2004. - № 2 (13). - С. 147 - 154.
14. *Oliver C.N., Borg-Whan Alm., Moerman E. J et al.* Age-related in oxidized proteins // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol. 262, No. 12. - P. 5488 - 5491.
15. *Stadman E.R., Oliver C.N.* Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences // J. Biol. Chem. - 1991. - Vol. 266, No. 4. - P. 2005 - 2008.
16. *Іванушко Я.Г., Гриневич Ю.П.* Корекція пострадіаційних змін пероксидного окислення ліпідів печінки щурів лазерним випромінюванням // Зб. наук. праць Ін-ту ядерних досл. - 2003. - № 2 (10). - С. 129 - 134.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Я. Г. Иванушко, Ю. П. Гриневич, Г. М. Чоботко

Исследовали влияние 30-суточного фракционированного излучения в суммарных дозах 0,3, 0,6, 0,9 и 1,2 Гр на окислительную модификацию белков печени крыс, которую оценивали по уровням альдегидо- и кетопроизводных динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера. Рентгеновское излучение вызывало увеличение продуктов окислительной модификации белков как нейтрального, так и основного характера по окончании облучения во всех дозах на 1-е и 10-е сутки, при этом большим был уровень альдегидо- и кетопроизводных основного характера. Через 20 и 30 сут показатели окислительной модификации белков приближались к контролю. Повышенный уровень продуктов окислительной модификации белков сохранялся до 30 сут после окончания облучения.

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEIN IN THE RATS' LIVER BY THE ACTION OF X-RAY

Ya. G. Ivanushko, Yu. P. Grinevich, G. M. Chobotko

We studied the 30 days long influence fractioned X-ray in total doses 0,3, 0,6, 0,9 and 1,2 Gr on the oxidative modification of protein in the rats' liver, which was valued by the level of aldehydo- and keto-derivatives of denitrofenilgirasone of neutral and main character. X-ray caused the increase of protein oxidative modification as well as neutral, so the main character after the completion of X-ray at all doses on the first and the tenth days; by this fact the level of aldehydo- and keto- derivatives of main character was higher. After 20 and 30 days the level of oxidative modification of protein verge to control (data verification). The higher level of protein oxidative modification has been saved till 30 days long after the completion of X-ray.

Надійшла до редакції 20.05.05,
після доопрацювання – 21.09.05