

Активность антиоксидантных ферментов и уровень свободнорадикальных процессов в ядрах клеток нейронов при низких дозах облучения

А. Ф. Протас

Украинский научный центр радиационной медицины АМН Украины
254050 Киев, ул. Мельникова, 53

Внешнее гамма-облучение крыс в дозе 0,1 — 1 Гр вызывает изменения активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и глутатионпероксидазы (ГП) ядер клеток нейронов коры головного мозга. Активность СОД максимальна в период первых двух суток. Облучение не изменяет суммарной активности КАТ и ГП. Наблюдается снижение активности глутатионредуктазы (ГР) в период до 5 сут после облучения, что сопровождается снижением содержания в ядре восстановленного глутатиона. Выявлено зависимое от дозы повышение стабильных продуктов пероксидации в отдаленные сроки после облучения. В модельных исследованиях на частично очищенных КАТ, ГП и ГР показано, что в присутствии повышенных концентраций свободных радикалов происходит снижение активности этих ферментов.

Введение. Известно, что до 25 % всего синглетного кислорода, генерируемого клеткой, имеет ядерное происхождение [1]. Соответственно этому в ядрах сосредоточена почти третья часть основных клеточных антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и пероксидазы [2]. Ранее было показано, что ядерная СОД значительно отличается по некоторым свойствам от митохондриальной и цитоплазматической и ассоциирована преимущественно с транскрипционно активным хроматином [3]. В работах [4, 5] показано, что внутри ядра концентрация восстановленного глутатиона поддерживается на некотором постоянном уровне что детерминировано генетически. В связи с этим предполагается наличие ядерной глутатионредуктазы. Эти обстоятельства указывают на важность надежной и скоординированной работы ядерной ферментативной антиоксидантной системы для защиты ДНК и хроматина в целом от токсического действия продуктов (как первичных, так и вторичных) свободнорадикальных реакций.

Антиоксидантным ферментам в предотвращении повреждения ДНК и хромосом уделяется большое внимание, и их огромное значение в этом процессе несомненно [6]. В то же время данные об их активности и эффективности работы в условиях воздействия ионизирующей радиации в литературе отсутствуют. Особый интерес могут представлять сведения об эффекте низких доз радиации, то есть, когда гибели клеток не происходит, и все возможные защитные клеточные реакции должны проявляться в максимальной степени. В связи с этим целью данной работы была оценка действия облучения гамма-квантами в диапазоне доз 0,1—1 Гр на актив-

ность ядерных антиоксидантных ферментов и уровень процессов перекисидации.

Материалы и методы. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар 4—5-месячного возраста. Животных подвергали однократному внешнему гамма-облучению на установке «Игур» (источник излучения ^{137}Cs), мощность дозы 1,88 Гр/мин. Ядра клеток коры больших полушарий головного мозга выделяли в сахарозной среде [7]. В ядрах определяли активность СОД [3], КАТ [8], глутатионпероксидазы (ГП) [9] и глутатионредуктазы (ГР) [10], а также содержание восстановленного глутатиона (ГSS) (с помощью реактива Элмана аналогично методу [11] после экстракции 5 %-й ТХУ), шиффовых оснований (ШО), диеновых конъюгатов липидов и малонового диальдегида (МДА) [12]. Фракционирование хроматина ДНКазой I проводили, как описано ранее [13]. Получали транскрипционно активную фракцию S1, фракцию с высокополимерным хроматином S2 и конечный осадок P. Хемилюминесцентный анализ фракций хроматина осуществляли на хемилюминиметре ХЛМНЦ с учетом известных рекомендаций [14, 15]. Реакцию инициировали H_2O_2 , регистрировали интенсивность быстрой вспышки и общую светосумму за 5 мин. Статистическую обработку результатов проводили, используя непараметрический метод анализа. Каждая группа состояла из 6—10 животных.

Результаты и обсуждение. Динамика изменений в содержании ГSS и продуктов перекисного окисления при облучении в дозе 1 Гр представлена на рис. 1 (для удобства здесь и далее данные приводятся в относительных единицах). Содержание ГSS снижается только в первый период после

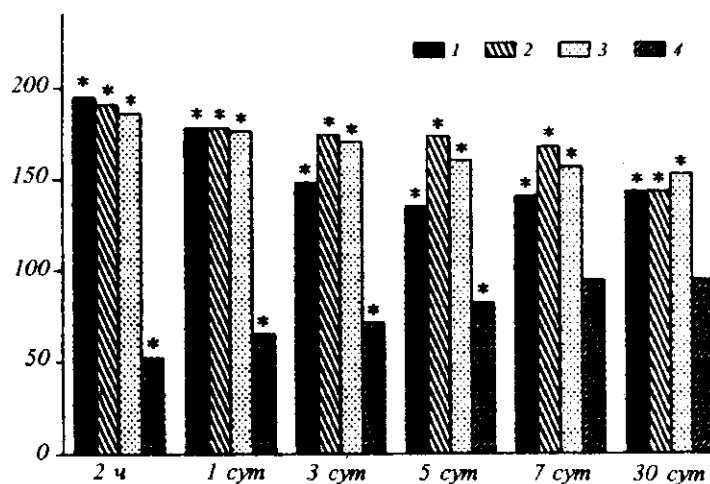


Рис. 1. Содержание в ядрах диенов (1), МДА (2), ШО (3) и ГSS (4) в различные сроки после облучения в дозе 1 Гр. (в процентах к контролю); * $p < 0,05$

облучения, затем следует возрастание его концентрации до исходной величины. Аналогичные изменения (но противоположной направленности) происходят и с содержанием конъюгированных диенов жирных кислот и МДА. Однако, в отличие от ГSS, их концентрация сохраняется на повышенном уровне даже через месяц после облучения. При этом в отдаленные сроки после облучения (30 сут) выявляется также и дозовая зависимость, хотя и весьма далекая от линейной (рис. 2). Корреляция в содержании промежуточных и конечных продуктов свободнорадикальных реакций свидетельствует о том, что какие-либо существенные препятствия в последовательной цепи их образования отсутствуют.

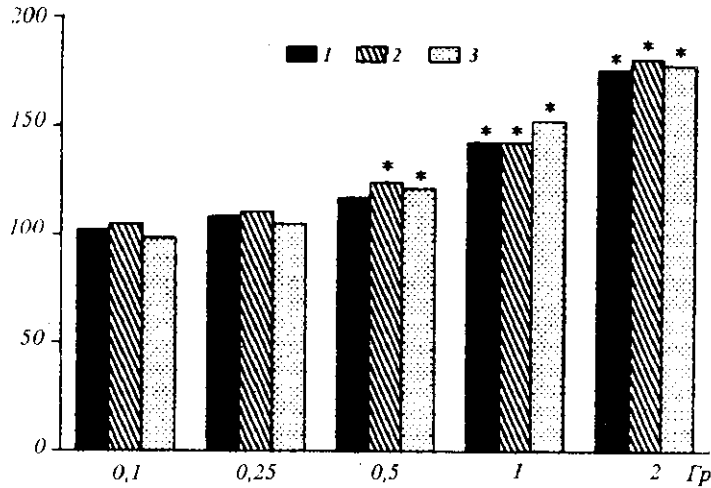


Рис. 2. Содержание в ядрах диенов (1), МДА (2), ШО (3) через 30 сут после облучения различными дозами (в процентах к контролю); * $p < 0,05$

Традиционно наличие МДА связывают с процессами пероксидации липидов, и аббревиатура ПОЛ уже стала весьма популярной. Несомненно, это так, но известно также, что процессу пероксидации могут подвергаться и другие классы биохимических компонентов клетки — углеводы, белки и нуклеиновые кислоты [19]. Целенаправленные исследования показывают, что в числе конечных продуктов этих процессов может быть МДА как продукт радиоллиза углеводного компонента [20]. Таким образом, повышение содержания МДА есть результат и критерий повреждений и деградации не только липидов, но и, как минимум, ДНК.

Уровень повышения продуктов пероксидации в отдаленные сроки имеет некоторую дозовую зависимость (рис. 3), однако достоверные изменения наблюдаются только при дозе 0,5 и 1 Гр.

Известно, что структура интерфазного хроматина гетерогенна, и для его функционального состояния весьма существенно, происходит ли равномерное повреждение ДНК и хроматина в целом или есть некоторая избирательность. В работах [18, 19] показано, что ядерный хроматин может генерировать продукты перекисного окисления липидов. При этом выявля-

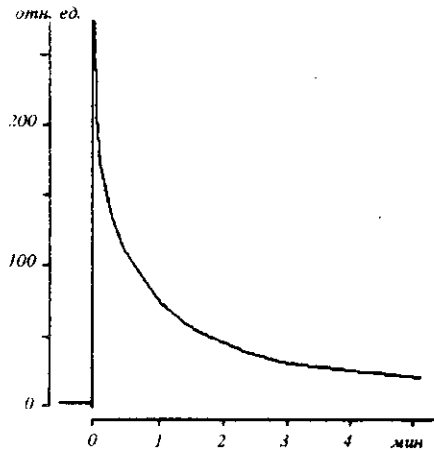


Рис. 3. Типичный вид хемилуминограммы хроматина при индукции H_2O_2

ется как ферментативнозависимая, так и независимая компоненты этого процесса. Чтобы оценить уровень свободнорадикальных процессов в различных фракциях хроматина при облучении проведен их хемилюминесцентный анализ. Типичная хемилюминограмма хроматина представлена на рис. 3 (шкала времени начата с момента инъекции H_2O_2). С учетом выявленной специфики протекания хемилюминесцентных реакций на хроматине для анализа использовали два основных параметра — высоту быстрой вспышки и общую светосумму. Хемилюминесценция, в частности, при индукции перекисью водорода есть интегральный показатель содержания соединений с высокой реакционной способностью [15, 16]. Детальные исследования по индукции процессов пероксидации ионами Fe^{2+} [18] во фракциях хроматина и микросомах позволяют считать, что возможный вклад ионов железа в регистрируемую хемилюминесценцию крайне низок и им можно пренебречь. В связи с этим быструю вспышку можно интерпретировать как количественный критерий уровня свободнорадикальных реакций, а светосумму — как общее количество реакционных группировок, но преимущественно с потенциальными радиопротекторными свойствами. Результаты приведены на рис. 4. В норме уровень светосуммы во фракции S1 (несущей активно транскрибируемые гены) ниже почти на 40 % (на рис. 4 не

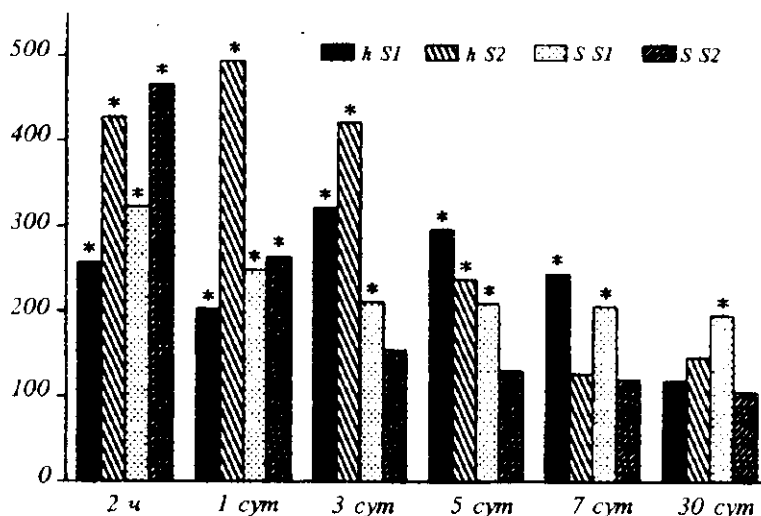


Рис. 4. Высота быстрой вспышки (h) и светосумма хемилюминесценции (S) фракций хроматина S1 и S2 после облучения в дозе 1 Гр (в процентах к контролю); *p < 0,05

приведено). В работе [18] показано, что фракция транскрипционно активного хроматина содержит почти в два раза больше ионов железа, чем таковая репрессированного, что также подтверждает отсутствие реального вклада железа в регистрируемую хемилюминесценцию. Облучение резко повышает интенсивность хемилюминесценции. Через сутки эти процессы несколько снижаются, однако далее следует новое повышение и в более поздние сроки (через 30 сут после облучения) часть параметров близка к норме. Вместе с тем на очень высоком уровне сохраняется величина светосуммы во фракции S1 — она превышена почти в два раза. Следовательно, в отдаленные сроки основную свободнорадикальную нагрузку будет испытывать транскрипционно активный хроматин. Несомненно, что это может приводить к определенным химическим модификациям ДНК и хроматина в целом и быть причиной неспецифического повреждения наиболее важной части генома.

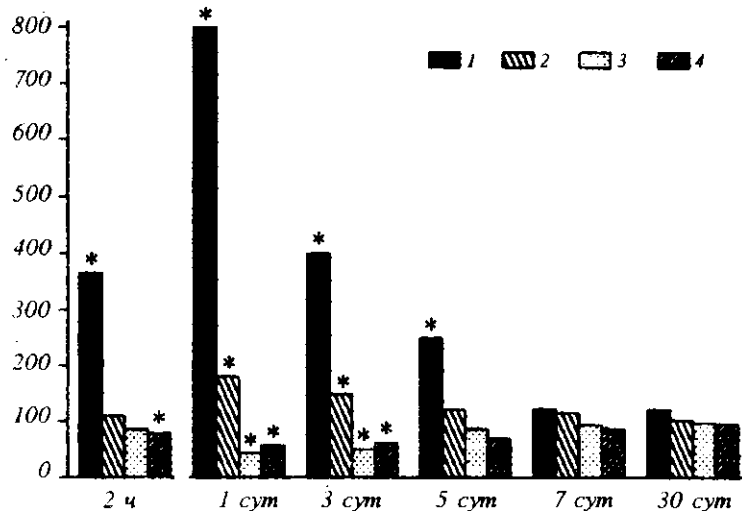


Рис. 5. Активность СОД (1), КАТ (2), ГП (3) и ГР (4) в различные сроки после облучения в дозе 1 Гр (в процентах к контролю); * $p < 0,05$

На рис. 5 представлены данные о влиянии облучения на относительную активность изучаемых ядерных ферментов. СОД наиболее интенсивно реагировала на облучение, в результате чего ее активность была повышена в период вплоть до 5-х сут после облучения, хотя максимум активности приходился на 2-е сут. В изменениях активности КАТ и ГП наблюдается определенная взаимозависимость. Повышение активности КАТ сопровождается соответствующим снижением ГП с последующей нормализацией активностей, т. е. их суммарная активность сохраняется практически на постоянном уровне. Наиболее вероятно, что в целом — это специфическая адаптивная реакция, направленная на более «экономный» способ антиоксидантной защиты. При таком соотношении не происходит дополнительной затраты энергии макроэргических соединений (восстановленного НАДФ) для регенерации окисленного глутатиона. Активность ГР несколько снижается в период до 5-х сут после облучения, далее следует устойчивая нормализация. Видимо, этим обусловлено восстановление концентрации ГСС.

В динамике изменений активности ферментов весьма существенно также следующее. Повышение активности СОД по времени не совпадает с изменениями в активностях КАТ и ГП. Продукт реакции, катализируемой СОД, — H_2O_2 — есть субстрат для КАТ и ГП. В связи с этим соотношение между активностью СОД и КАТ — ГП в период до 5-х сут после облучения может быть расценено как весьма неблагоприятное. В условиях такой разбалансировки ферментативной антиоксидантной системы уже сама эта система может выступать дополнительным источником свободнорадикальных продуктов.

Известно, что значение ГП-системы в общей антиоксидантной системе ограничивается, в основном, удалением низких концентраций перекиси водорода, в то время как при ее более высоких концентрациях основную нагрузку несет КАТ [21]. Отметим, что это происходит на фоне повышения активности СОД. Снижение активности ГП после облучения в этом случае можно рассматривать как нормальную физиологическую реакцию на интенсификацию свободнорадикальных процессов в целом и генерации повышенных количеств H_2O_2 — в частности. Общепринято, что СОД является ферментом индуцибельным, т. е. она чутко реагирует на повышение содержания субстрата (путем дополнительного синтеза фермента). Таким

образом, если перераспределение в активностях КАТ и ГП отражает интенсификацию генерации вторичных свободнорадикальных реакций, то повышение активности СОД свидетельствует о значительной интенсификации процессов генерации первичных кислородных свободнорадикальных соединений.

Ранее было показано, что при таких же дозе облучения и сроках наблюдаются значительные изменения в изоферментном спектре ферментов коры головного мозга крыс [21]. В частности, происходили колебания в содержании изоформ лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В период 1—2-х сут после облучения содержание ЛДГ, повышалось с 28 до 41 % через 2 ч после облучения и до 45 % — через 1 сут. Далее ее содержание постепенно нормализовалось. Известно, что изоформа ЛДГ, обеспечивает, в основном, аэробные процессы метаболизма и наиболее активна именно в клетках с высоким уровнем поглощения кислорода [22].

Эти обстоятельства позволяют заключить, что в данный период происходит значительная активизация обмена веществ с участием кислорода, что в свою очередь повышает уровень спонтанного образования кислородных свободных радикалов. Надо полагать, именно такой каскад взаимозависимых процессов есть причиной повышения фонового уровня свободнорадикальных процессов (что проявляется в повышенном содержании промежуточных и конечных продуктов пероксидации) в отдаленные периоды после облучения. С другой стороны, несомненно, что подобная дискоординация возможна только в том случае, если уже в первый период после облучения произойдут определенные нарушения на уровне генома, не позволяющие адекватно корректировать процессы метаболизма.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что низкие дозы ионизирующей радиации могут создать условия, способствующие повреждению генома как в ближайшие, так и в отдаленные сроки после облучения.

О. Ф. Протас

Активність антиоксидантних ферментів та рівень вільнорадикальних процесів у ядрах клітин нейронів за низьких доз опромінення

Резюме

Зовнішнє гама-опромінення щурів у дозі 0,1—1 Гр викликає певні зміни в активності супероксиддисмутази, каталази, пероксидази та глутатіонредуктази ядер нейронів кори головного мозку. Активність супероксиддисмутази максимальна у період перших двох днів після опромінення. Опромінення не змінює сумарної активності каталази та пероксидази. Зниження активності глутатіонредуктази спостерігається до 5-ї доби після опромінення, що супроводжується падінням концентрації відновленого глутатіону у ядрі. Виявлено залежне від дози підвищення концентрації стабільних продуктів пероксидації у віддалені строки після опромінення. У модельних дослідженнях показано, що підвищені концентрації вільнорадикальних кисневих сполук призводять до зниження активності каталази, пероксидази та глутатіонредуктази, частково очищених з ядер нейронів кори головного мозку.

A. F. Protas

The activity of antioxidant enzymes and free-radical processes in neurones cells nucleus under low-dose irradiation

Summary

The external gamma-irradiation of rats under 0.1—1 Gy alters the activity of nuclear superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GP) and glutathione-reductase (GR). The activity of SOD is maximal at the first two days after irradiation. Irradiation not alters the summal CAT and GP activity. The activity of GR decreased just after irradiation, but it is restored in 5 days. This process is

correlated with decrease of the reduced glutathione. The increasing of stable free-radical products is observed. It has some dependence on dose of irradiation. The model analysis of purified CAT, GP and GR showed, that under exposure with free radicals the activities of these enzymes are decreased.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вартамян Л. С., Раиба Ю. Э., Наглер Л. Г. Мембраны субклеточных органелл как источник супероксидных радикалов при ишемии // Бюл. эксперим. биологии медицины.—1990.—№ 6.—С. 550—552.
2. Maestro Del R., McDonald W. Subcellular localization of superoxide dismutases, glutathione peroxidase and catalase in developing rat cerebral cortex // Mech. Ageing and Develop.—1989.—48, N 1.—P. 15—31.
3. Протас А. Ф., Чаяло П. П. Супероксиддисмутаза ядер клеток коры головного мозга крыс — выделение, свойства, влияние ионизирующей радиации // Укр. биохим. журн.—1993.—65, № 2.—С. 73—78.
4. Solen G., Edgren M., Scott O. C. A., Revesz L. Cellular glutathione content and K values. I // Int. J. Radiat. Res.—1987.—51, N 1.—P. 39—44.
5. Solen G., Edgren M., Scott O. C. A., Revesz L. Cellular glutathione content and K values II // Ibid.—1989.—55, N 2.—P. 201—210.
6. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer — possible role of clastogenic factors in carcinogenesis // Free Rad. Biol. Med.—1994.—16, N 1.—P. 99—109.
7. Wynter C. V. A. Persistence of altered RNA synthesis in rat cerebral cortex 12 h after a single electroconvulsive shock // J. Neurochem.—1979.—32, N 4.—P. 495—504.
8. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.—1988.—№ 1.—С. 16—19.
9. Gunzler W. A., Kramers H., Flohe L. An improvement coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood // Z. klin. Chem. und klin. Biochem.—1974.—N 12.—P. 444—448.
10. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982.—272 с.
11. Торчинский Ю. М. Сера в белках.—М.: Наука, 1977.—302 с.
12. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.—М.: Медицина, 1977.—68 с.
13. Протас А. Ф., Чаяло П. П. Влияние низких доз внешнего гамма-облучения на структуру хроматина и активность гистон-специфических протеиназ клеток головного мозга крыс // Радиобиология.—1991.—31, № 6.—С. 733—738.
14. Барабой В. А., Орел В. Э., Карнаух И. М. Перекисное окисление и радиация.—К.: Наук. думка, 1991.—253 с.
15. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.—М.: Наука, 1972.—252 с.
16. Lardinois O. M. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide // Free Rad. Res.—1995.—22, N 3.—P. 251—274.
17. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л. Механизмы перекисного окисления липидов фракций хроматина печени крыс // Биополимеры и клетка.—1993.—9, N 5.—С. 34—43.
18. Левицкий Е. Л., Губский Ю. И. Свободнорадикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки // Укр. биохим. журн.—1994.—66, N 4.—С. 18—30.
19. Free radicals in molecular biology, aging and disease / Ed. by D. Armstrong.—New York: Raven press, 1984.—Vol. 27.—540 p.
20. Giulivi C., Boveris A., Cadenas E. Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA // Arch. Biochem. and Biophys.—1995.—316, N 2.—P. 909—916.
21. Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, biology and medicine / Ed. by G. Rotilio.—Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1986.—688 p.
22. Чаяло П. П., Протас А. Ф. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, эстеразы и кислой фосфатазы клеток головного мозга крыс в разные сроки после внешнего гамма-облучения в дозе 1 Гр // Радиобиология.—1992.—32, N 6.—С. 815—819.