

<https://doi.org/10.3176/biol.1971.2.04>

УДК 577.15.035

ЮЛО ВАХЕР, УНО КАНАРИК, ЭЭЗИ ВАРЬЕНД

ОБ ИЗМЕНЕНИЯХ АКТИВНОСТИ АТФ-АЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГАММА-ОБЛУЧЕНИИ

Изучение характера изменений активности ферментных систем в тканях организма имеет исключительно важное значение для понимания действия ионизирующих излучений на биологические объекты (Кузин, 1962). Изменения активности ферментных систем не только отражают сдвиги в обмене веществ, важных в жизнедеятельности организма, но могут быть также причинами возникновения патологических процессов. Это вызвало в радиобиологии интерес к ферментам, однако для правильного понимания роли ферментов в патогенезе лучевых поражений необходимо сопоставление изменений их активности при облучении *in vitro* и *in vivo*. К сожалению, в большинстве исследований такое сравнение не проводилось.

В радиобиологии интерес к АТФ-азе возрос особенно после того, как Е. С. Дж. Барроном была показана ее сверхвысокая радиочувствительность при облучении в чистых разбавленных растворах (Barron и др., 1949). В некоторых исследованиях изучена активность АТФ-азы в гомогенатах тканей или митохондриях, выделенных из органов облученных животных. Большинство результатов свидетельствует об активации АТФ-азы в селезенке (Ashwell, Hickman, 1952, 1953; Maxwell, Ashwell, 1953; Petersen и др., 1953; Dubois, Petersen, 1954; van Bekkum, 1955; Breuer, Parchwitz, 1959) и отсутствии ее изменений в печени (van Bekkum, 1956; Breuer, Parchwitz, 1959; Hanson, 1966; Tardiff, Dubois, 1966; Зубенко и др., 1968). По данным М. Дж. Орд и Л. А. Стокен (Ord, Stosken, 1955), уже через 90 мин после облучения крыс рентгеновскими лучами в дозе 1000 p АТФ-азная активность митохондрий селезенки увеличивается на 30%. Другие авторы обнаружили подобную активацию через 3 или 4 ч после облучения (Ashwell, Hickman, 1952; Potter, Bethel, 1952) или еще позже (Smith и др., 1954). Через две недели после облучения увеличение активности АТФ-азы сменяется ее уменьшением. В печени мышей, однако, обнаружено уменьшение активности АТФ-азы даже через час после облучения (Ghizari, 1967a). Д. Томсон и его сотрудники не обнаружили изменений в тимусе крыс (Thomson и др., 1952). В мозге мышей отмечено уменьшение активности АТФ-азы (Ghizari, 1967b), а в мозге морских свинок ее увеличение (Jonek и др., 1966). В надпочечниках крыс активность АТФ-азы уменьшается (Brezekinski, 1966). Различия в результатах, полученных разными авторами, объясняются отчасти различиями в методиках, особенно в способе расчета активности АТФ-азы (на мг белка, на вес органа и т. д.), а также в рН инкубационной среды. Так, в саркозомах сердца через 1 ч после облуче-

ния при рН 6,5 происходит уменьшение, а при рН 8,5 — увеличение активности АТФ-азы (Dancewicz и др., 1965). Определенное значение имеет и длительность инкубации, так как в препаратах облученных объектов процесс так наз. старения происходит быстрее по сравнению с препаратами необлученных объектов (Хансон, 1966).

Данные об изменении АТФ-азной активности эритроцитов крайне скудны и противоречивы и относятся почти без исключения к облучению *in vitro* (Bresciani и др., 1962; Myers, Church, 1967). Для выяснения действия гамма-облучения на активность АТФ-азы исследовались изменения ее активности при облучении эритроцитов *in vivo* и *in vitro*.

Методика

В опытах использовались белые мыши и кролики. У мышей кровь бралась декапитацией, а у кроликов — прорезом ушной вены. В качестве антикоагулянта применялся гепарин. Эритроциты отделялись центрифугированием, затем трижды промывались 0,9%-ным раствором NaCl. Гемолизат приготавливался добавлением к эритроцитарной массе ледяной бидистиллированной воды (1:2).

Активность АТФ-азы гемолизата определялась по нарастанию содержания неорганического фосфата в реакционной смеси, содержащей 0,6 мл *tris*-буфера (рН—7,8), 0,4 мл 0,04 М АТФ-Na, 0,3 мл 0,584%-ного MgSO₄, 0,3 мл воды и 0,4 мл гемолизата. После 30 мин инкубации при 38°C в смесь добавлялось 2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. В фильтрате определялся неорганический фосфор по модифицированному методу Фиске и Суббароу. Для этого к 0,5 мл фильтрата добавляли 0,5 мл 2,5%-ного молибденовокислого аммония, 0,6 мл 1,7%-ной аскорбиновой кислоты, 0,4 мл 2,5 М сернокислой меди и 3 мл ацетатного буфера с рН 4,4—4,6, и затем колориметрировали на ФЭК-60 с фильтром № 8 ($\lambda=830$ нм). Активность АТФ-азы рассчитывалась из разницы содержания неорганического фосфора в двух параллельных, взятых в начале и после инкубации пробах. Активность выражалась в мг неорганического фосфора на 1 г гемоглобина.

Облучение крови и гемолизатов проводилось на установке Луч-1 (⁶⁰Со; мощность дозы 400 р/мин). При облучении мышей применялись дозы в диапазоне от 500 до 1000 р. Кровь бралась через 2 ч, 2 дня, 2 и 4 недели после облучения.

Результаты

При облучении *in vitro* эритроцитов и изготовленных из них гемолизатов заметное понижение активности АТФ-азы наблюдалось лишь начиная с дозы 15—20 кр (рис. 1). Оказалось, что при облучении цельных эритроцитов АТФ-аза менее чувствительна по сравнению с АТФ-азой гемолизата той же крови.

При общем однократном облучении мышей в дозах от 500 до 1000 р (сублетальные и летальные дозы) изменения активности АТФ-азы эритроцитов отмечались при меньших дозах, чем при облучении эритроцитов *in vitro*. Динамика изменений активности АТФ-азы эритроцитов имела фазный характер.

Через 2 ч после облучения в шести сериях опытов наблюдалось как снижение, так и повышение активности АТФ-азы по сравнению с контролем. Оказалось, что направление сдвигов активности фермента зависит от дозы облучения, а также от исходного уровня ее активности. Из рис. 2 видно, что показатели активности фермента снижались при дозах свы-

ше 875 p и в то же время находились в пределах физиологических колебаний. Из этого можно сделать вывод, что после однократного облучения можно наблюдать сдвиги активности АТФ-азы уже в ближайшие сроки, но направленность этих сдвигов определяется как исходным уровнем активности фермента, так и применяемой дозой. При низком исходном уровне отмечается повышение, а при высоком — понижение активности фермента.

В отдаленные сроки после облучения, как правило, наблюдалась заметная активность этого фермента (рис. 2), которая постепенно увеличивалась к концу опыта. При дозе 500 p эта активация была мало заметной, однако при более высоких дозах — достаточно выраженной, достигая 150% исходного уровня. При дозах 750 и 875 p максимум активации достигался на пятнадцатый день, а при дозах 625, 900 и 1000 p — на тридцатый день опыта. Такое увеличение активности АТФ-азы в отдаленные сроки, по-видимому, объясняется увеличением содержания ретикулоцитов в периферической крови (Yunis, Arimura, 1966).

По изложенному выше можно сделать вывод, что после облучения эритроцитов *in vitro* наблюдается изменение активности АТФ-азы только при облучении относительно высокими дозами (в пределах 15—20 кр). При облучении гемолизата снижение активности АТФ-азы почти вдвое больше, чем при облучении цельных эритроцитов той же крови. По-видимому, целостная клеточная структура является для АТФ-азы эритроцитов определенной небольшой защитой.

Обстоятельство, что через 2 ч после общего однократного облучения животных дозами от 500 до 1000 p наблюдались ранние изменения активности АТФ-азы эритроцитов, свидетельствует об опосредованном характере этих изменений, так как при облучении эритроцитов *in vitro* вышеуказанными дозами ионизирующей радиации изменения в активности АТФ-азы не наблюдались. По-видимому, причиной этих ранних изменений АТФ-азы можно считать появление в циркулирующей крови как радиотоксинов, так и гормонов (адреналин, гистамин и др.). Незысн-

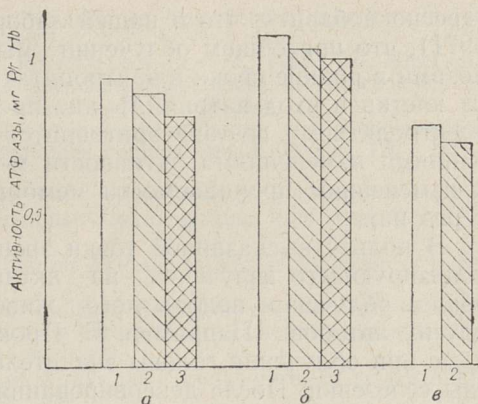


Рис. 1. Изменение активности АТФ-азы эритроцитов при γ -облучении *in vitro*: а — кролики (20 кр); б — кролики (15 кр); в — мыши (20 кр).

1 — необлученные эритроциты; 2 — облученные эритроциты; 3 — облученные гемолизаты.

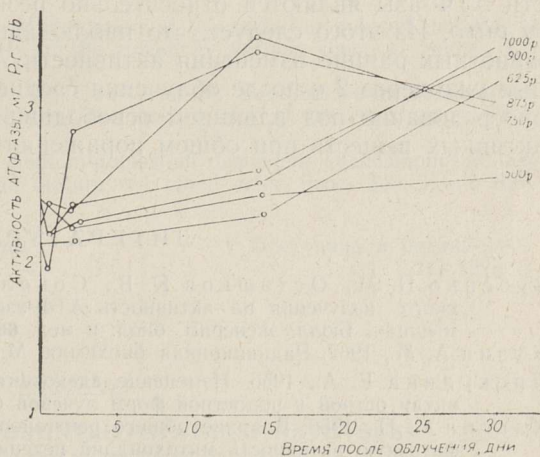


Рис. 2. Изменение активности АТФ-азы эритроцитов мышей при их γ -облучении.

интересно добавить, что в нашей лаборатории установлено (Харламова, 1971), что при общем облучении мышей летальными и сублетальными дозами в ранние сроки в эритроцитах происходит усиленный выход калия из клетки и вход натрия. Можно предположить, что названные сдвиги в электролитном составе эритроцитов тесно связаны с установленными ранними изменениями активности мембранной АТФ-азы, приводящими к изменениям проницаемости мембран и активного транспорта ионов через них.

В пользу высказанной точки зрения об опосредованном действии ионизирующего излучения на активность АТФ-азы эритроцитов при общем облучении подопытного животного говорят также наблюдения других авторов. Например, Е. Прокудина (1956) обнаружила, что у крыс при облучении головы значительно увеличивается активность АТФ-азы селезенки. После денервирования селезенки и удаления надпочечников подобное увеличение активности не наблюдалось. В опытах с облучением изолированных митохондрий, гомогенатов тканей, а также изолированных органов заметные изменения активности АТФ-азы были достигнуты лишь относительно высокими дозами облучения (свыше 20 кр) (Maxwell, Ashwell, 1953; Ord, Stocken, 1955; van Bekkum, 1956).

В заключение можно сказать, что эритроциты периферической крови, использованные как модели для исследования поражающего действия ионизирующих излучений на мембраны клетки, по изменениям активности АТФ-азы являются относительно резистентными к гамма-облучению *in vitro*. Из этого следует, что наблюдавшиеся при общем облучении животных ранние изменения активности АТФ-азы эритроцитов, выявленные уже через 2 ч после облучения среднелетальными дозами, возникают опосредованно под влиянием освободившихся из тканей биологически активных веществ при общем поражении организма.

ЛИТЕРАТУРА

- Зубенко П. М., Осташков К. В., Соколов И. И., 1968. Влияние рентгеновского излучения на активность АТФ-азы в денервированных и интактных мышцах. Бюлл. эксперим. биол. и мед. **66** : 31—32.
- Кузин А. М., 1962. Радиационная биохимия. М.
- Прокудина Е. А., 1956. Изменение аденозинтрифосфатазной активности при развитии острой и подострой форм лучевой болезни. Мед. радиология **1** : 46.
- Хансон К. П., 1966. Влияние общего рентгеновского облучения на аденозинтрифосфатазную активность митохондрий печени крыс. Вопр. мед. химии **12** : 254—258.
- Харламова Х., 1971. О ранних изменениях содержания калия и натрия в эритроцитах плазмы крови после гамма-облучения мышей. Изв. АН ЭССР. Биол. **20** (в печати).
- Ashwell G., Hickman J., 1952. Effect of X-irradiation upon the enzyme systems of mouse spleen. Proc. Soc. Exptl Biol. and Med. **80** : 407—410.
- Ashwell G., Hickman J., 1953. The properties of spleen adenosintriphosphatase and the effect of X-irradiation. J. Biol. Chem. **201** : 651.
- Barron E. S. G., Dickman Sh., Muntz J. A., Singer Th. P., 1949. Studies on the mechanism of action ionizing radiations. I. Inhibition of enzymes by X-rays. J. Gen. Physiol. **32** : 537—552.
- Bekkum D. W. van, 1955. The disturbance of oxidative phosphorylation and the breakdown of ATP in spleen tissue after irradiation. Biochim. Biophys. Acta **16** : 437.
- Bekkum D. W. van, 1956. Oxidative phosphorylation in some radiosensitive tissues after irradiation. In : Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism : 77—89.
- Bresciani F., Auricchio F., Fiore C., 1962. Mechanism of X-ray inhibition of the sodium pump in human erythrocytes: Adenosintriphosphatase activity of stromata. Nature **196** : 186—187.
- Breuer H., Parchwitz H. K., 1959. Über das Verhalten der Adenosintriphosphatase in der Milz und Leber totalbestrahlter Mäuse. Strahlentherapie **108** : 93—96.

- Brezezinski R., 1966. Effects of X-ray irradiation on histochemical reactions in rat adrenals. Polish. Endocrin. 17 : 176—187.
- Dancewicz A. M., Malinowska T., Rzepniewska D., 1965. The effect of ionizing radiation on the activity of adenosintriphosphatase in mitochondria of rat liver, spleen and heart. Acta Biochim. Polon. 12 : 85—94.
- Dubois K. P., Petersen D. F., 1954. Adenosine triphosphatase and 5-nucleotidase activity of hematopoietic tissues of irradiated animals. Am. J. Physiol. 176 : 282—286.
- Ghizari E., 1967a. The radioprotective effect of glycine during X-irradiation: radioprotection according to the time of administration of glycine. Rum. Med. Rev. 11 : 69—72.
- Ghizari E., 1967b. Effect of ionizing radiation on ATP-ase activity in the brain of mice. Stud. Cercet. Biochim. 10 : 137—139.
- Jonek J., Kosmider S., Jonek T., 1966. Badania histochemiczne nad zachowaniem sie niektórych enzymów mózgu w różnych okresach ostrej choroby popromiennej. Polski przegl. radiol. i med. nukl. 30 : 307—315.
- Maxwell E., Ashwell G., 1953. Effect of X-rays on P metabolism in spleen mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 43 : 389.
- Myers D. K., Church M. L., 1967. Inhibition of stromal enzymes by X-radiation. Nature 213 : 636—637.
- Ord M. G., Stocken L. A., 1955. The effects of radiation in vitro on oxidative phosphorylation and adenosintriphosphatase. Brit. J. Radiol. 28 : 279—282.
- Petersen D. F., Dequin J., Dubois K. P., 1953. Effects of sublethal doses of X-ray on phosphatases of animal tissues. Federat. Proc. 12 : 356.
- Potter R. L., Bethel F. H., 1952. Oxidative phosphorylation in spleen mitochondria. Federat. Proc. 11 : 270.
- Smith W. W., Anderson W., Ashwell G., 1954. Spleen adenosine triphosphatase activity in irradiated mice treated with spleen homogenate. Am. J. Physiol. 178 : 471—473.
- Tardiff R. G., Dubois K. P., 1966. Modification of the radiation induced increase in adenosine triphosphatase activity of the spleen by various chemical agents. US AEC Report AD-637575.
- Thomson J. F., Tourtellotte W. W., Carthar M. S., 1952. Some observations on the effect of gamma radiation on the biochemistry of the rat thymus. Proc. Soc. Exptl Biol. Med. 80 : 268.
- Yunis A. A., Arimura G. K., 1966. Sodium-potassium dependent adenosinphosphatase of mammalian reticulocytes and mature red blood cells. Proc. Soc. Exptl Biol. Med. 121 : 327—329.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
2/III 1970

ÜLO VAHER, UNO KANARIK, EESI VARJEND

ERÜTROTSÜÜTIDE ADENOSIINTRIFOSFATAASI AKTIIVSUSE MUUTUSTEST GAMMAKIIRGUSE TOIMEL

Resümee

Uuriti hiire ja küüliku erütrotsüütide adenosintrifosfataasi aktiivsuse muutusi pärast nende gammakiiritamist ^{60}Co *in vitro* ja *in vivo*. Leiti, et *in vitro* gammakiirguse mõjul väheneb erütrotsüütide adenosintrifosfataasi aktiivsus ainult suhteliselt suurte kiirgusdooside — 15—20 kr — kasutamise korral. Sama vere hemolüsaadi kiiritamisel vähenes fermendi aktiivsus peaaegu kahekordselt. Hiirte kiiritamisel mitmesuguste — 500—1000 r — doosidega oli erütrotsüütide adenosintrifosfataasi aktiivsus 2 tundi pärast seda algtasemega võrreldes kas mõõdukalt tõusnud või langenud. Kiiritustõve kestel aga suurenes adenosintrifosfataasi aktiivsus tunduvalt (arvestatud 1 g hemoglobiinile) ning saavutas kulminatsiooni kas 15. või 30. katsepäevaks. Adenosintrifosfataasi varajased muutused on seletatavad kas radiotoksiinide, hormoonide või mõnede teiste bioloogiliselt aktiivsete ainete mõjuga, hilised aga erütrotsüütide noorte vormide arvu tunduva suurenemisega perifeerses veres. Kriipsutatakse alla erütrotsüütide adenosintrifosfataasi suhteliselt suurt resistentsust ioniseeriva kiirguse kahjustava toime suhtes ning tõstetakse esile bioloogiliselt aktiivsete ainete osa adenosintrifosfataasi aktiivsuse varajastes muutustes loomade kiiritamisel.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetuse saabunud
2. III 1970

ÜLO VAHER, UNO KANARIK, EESI VARIEND

ÜBER DIE AKTIVITÄTSVERÄNDERUNGEN DER ADENOSINTRIPHOSPHATASE VON ERYTHROZYTEN UNTER DER EINWIRKUNG VON GAMMASTRAHLEN

Zusammenfassung

Die Adenosintriphosphatase der Erythrozyten bei weißen Mäusen und Kaninchen wurde nach der Gammabestahlung mit ^{60}Co *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die Verfasser stellten fest, daß die Aktivität der ATP-ase der roten Blutkörperchen nach einer Gammabestahlung sich erst bei Dosen von 15 bis 20 Kr vermindert. Nach der Bestahlung von Hämolysaten wurde eine bis zweimal größere Verminderung der Aktivität beobachtet. Nach einer Gammabestahlung von Mäusen mit Dosen von 500—1000 r zeigte die Aktivität der ATP-ase von roten Blutkörperchen nach zwei Stunden eine leichte Verminderung oder Vergrößerung im Vergleich zum Ausgangsniveau. Später, nach Ausbruch der Strahlenkrankheit, wurde eine starke Erhöhung der Aktivität mit einer Kulmination am 15. oder 30. Versuchstag beobachtet. Die frühen, 2 Stunden nach der Bestahlung der Mäuse beobachteten Veränderungen der Enzymaktivität werden als durch Radiotoxine, Hormone oder andere biologisch aktive Stoffe hervorgerufen betrachtet. Die späten aber scheinen durch eine zahlenmäßige Zunahme der jungen Formen der Erythrozyten verursacht worden zu sein.

*Institut für Experimentalbiologie
der Akademie der Wissenschaften der Estnischen SSR*

Eingegangen
am 2. März 1970