

УДК 577.391.547.962.3

БИОХИМИЯ

Н. И. ЖИВОТОВА, И. В. ФИЛИПОВИЧ, Е. Ф. РОМАНЦЕВ

## ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 3',5'-ЦИКЛОАМФ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ТИМОЦИТАХ КРЫС

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 30 I 1975)

Известно, что малые лимфоциты тимуса (timoциты) отличаются большой радиочувствительностью и гибнут в первые часы после облучения (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). Эти клетки являются удобной моделью при изучении радиационного поражения организма. Сравнение биохимических изменений, развивающихся в клетках при облучении животного и изолированных тимоцитов, дает возможность сделать вывод о вкладе гормональной и нервной регуляции в наблюдаемый эффект. По данным ряда авторов, изучение изменения фонда эндогенного цАМФ может иметь существенное значение для понимания отдельных сторон патогенеза лучевой болезни и механизма действия радиопротекторов различных классов (<sup>3-5</sup>). Вместе с тем данных о влиянии понижающей радиации на фермент распада 3',5'-цАМФ — фосфодиэстеразу (3',5'-цАМФ-фосфогидролиза, КФ 3.1.4.1) в литературе нет. Поэтому задачей настоящей работы было изучение активности этого фермента в тимоцитах крыс на ранних сроках после облучения как животных, так и изолированных клеток.

Вся работа проведена на беспородных крысах-самцах весом 70–100 г. Дважды отмывую суспензию тимоцитов в кребс-рингер-фосфатной среде (5,5 мМ глюкоза, 0,13 М NaCl, 5,0 мМ KCl, 1,25 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,0 мМ MgSO<sub>4</sub>, 2,37 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,83 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7,2 облучали в тефлоновых пробирках 12×3 см, по 10 мл суспензии в каждой при концентрации клеток 2·10<sup>7</sup> кл в 1 мл. Облучение проводили γ-лучами <sup>60</sup>Co мощностью 240 р/мин. После облучения клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали, доводили кребс-рингер-фосфатной средой до исходного объема и инкубировали при 37° в течение различного времени. Подсчет количества погибших клеток вели в камере Горяева после прокрашивания их 0,2% эозином (к 0,1 мл суспензии добавляли 0,08 мл раствора эозина). Для определения фосфодиэстеразной активности клетки осаждали центрифугированием, лизировали небольшим количеством воды и осадок удаляли центрифугированием в течение 10 мин. при 5000 g. В надосадочной жидкости микробиуретовым методом определяли белок и использовали его как источник фермента. Метод определения фосфодиэстеразной активности основан на превращении 8-<sup>14</sup>C-цАМФ в 8-<sup>14</sup>C-5'-АМФ. В работе использовали препарат 8-<sup>14</sup>C-3', 5'-циклоАМФ с удельной радиоактивностью 117 мС/ммоль («Амершам», Англия). После окончания инкубации пробы выдерживали на кипящей водяной бане в течение 3 мин., охлаждали и добавляли в качестве носителя по 0,1 мл (0,2 мг) холодного 5'-АМФ. 0,1 мл инкубата наносили на листы хроматографической бумаги Ватман 3 мм. Хроматограммы проявляли нисходящим методом в системе 1 М ацетат аммония — 95% этанол (15:35) в течение 20 час. В этой системе получены следующие величины: АТФ 0,05; АДФ 0,08; 5'-АМФ 0,14; 3',5'-цАМФ 0,42; аденозин 0,59. Пятна, соответствующие 5'-АМФ, вырезали и помещали в кюветы, содержащие по 10 мл сцинтиллятора (5 г ППО, 0,2 г ПОПОП в 1 л толуола). Радиоактивность подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике Пакард — Трикарб.

Первая серия экспериментов была посвящена изучению влияния облучения на выживаемость тимоцитов. На рис. 1 приведена зависимость количества живых клеток от дозы и времени после облучения клеток *in vitro*. Эти данные хорошо совпадают с имеющимися в литературе <sup>(2)</sup>. Аналогичные, хотя и менее выраженные, зависимости были получены при облучении крыс в тех же дозах. В этом случае облученных животных декапитировали через каждый час. Получали суспензию тимоцитов и подсчитывали количество живых клеток описанным выше методом.

Результаты экспериментов по влиянию облучения крыс и клеток на фосфодиэстеразную активность тимоцитов приведены на рис. 2. Как видно, эффект облучения клеток зависит от дозы (кривые 1 и 2). Влияние дозы при облучении животных менее выражено (кривые 3 и 4), особенно при пересчете данных на 1 мг белка в пробе (кривая 3). Резкое ингибирование фосфодиэстеразной активности в опытах *in vivo* и *in vitro*, наблюдаемое через 5 час. после облучения, очевидно, связано с гибелью тимоцитов. Это подтверждается пересчетом результатов на число живых клеток в этот срок. Вместе с тем активация фермента, заметная через 1 час в опытах *in vitro* и через 1–2 часа в опытах *in vivo*, при пересчете на количество живых клеток в эти сроки после облучения становится еще более выраженной. Тот факт, что активация фермента имеет место как в опытах *in vitro*, так и в опытах *in vivo*, говорит о том, что этот эффект радиации реализуется, вероятно, на клеточном уровне, а не определяется изменениями, происходящими на уровне организма.

Мы попытались выяснить причину временного повышения активности фермента через 1 час после облучения. Было обнаружено, что внесение в инкубационную среду кребс-рингер-фосфатного раствора, проникновение компонентов которого в тимоциты может изменяться после облучения клеток, не отражается на активности фосфодиэстеразы и, следовательно, не может быть причиной активации фермента. Известно, что в ряде органов фосфодиэстераза находится как в связанной с мембранами, так и в растворимой формах <sup>(6, 7)</sup>. Для того чтобы исключить возможность повышения активности растворимого фермента в результате солюбилизации при облучении связанной фосфодиэстеразы, мы определяли активность в надосадочной жидкости и в дважды промытом осадке после центрифугирования при 105 000 *g*. Фосфодиэстеразной активности в осадке использованным нами методом не обнаруживалось, т. е. практически весь фермент в тимоцитах крыс находится в растворимой форме. Кроме того, нами была рассмотрена возможность активации фермента за счет его синтеза *de novo*, который мог усиливаться после облучения. Для этого была проведена следующая серия опытов: к контрольным и облученным в дозе 1000 р тимоцитам сразу после облучения добавляли пуромицин в концентрации, обычно ингибирующей белковый синтез в животных клетках (100 мкг/мл) <sup>(8)</sup>. Тимоциты инкубировали при 37° в течение часа и определяли фосфодиэстеразную активность. Было обнаружено, что пуромицин в этой концентрации на 10–25% ингибирует активность фермента как в контрольных, так и в облученных клетках. В то же время пуромицин не влияет на жизнеспособность тимоцитов, и эффект активации фосфодиэстеразы в пробах с пуромицином через

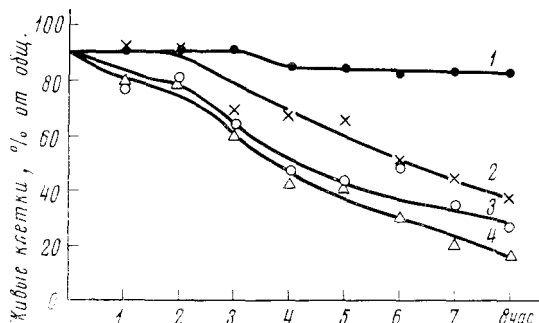


Рис. 1. Влияние облучения в дозах 250 р (2), 500 р (3) и 1000 р (4) на выживаемость тимоцитов. 1 — жизнеспособность контрольных клеток

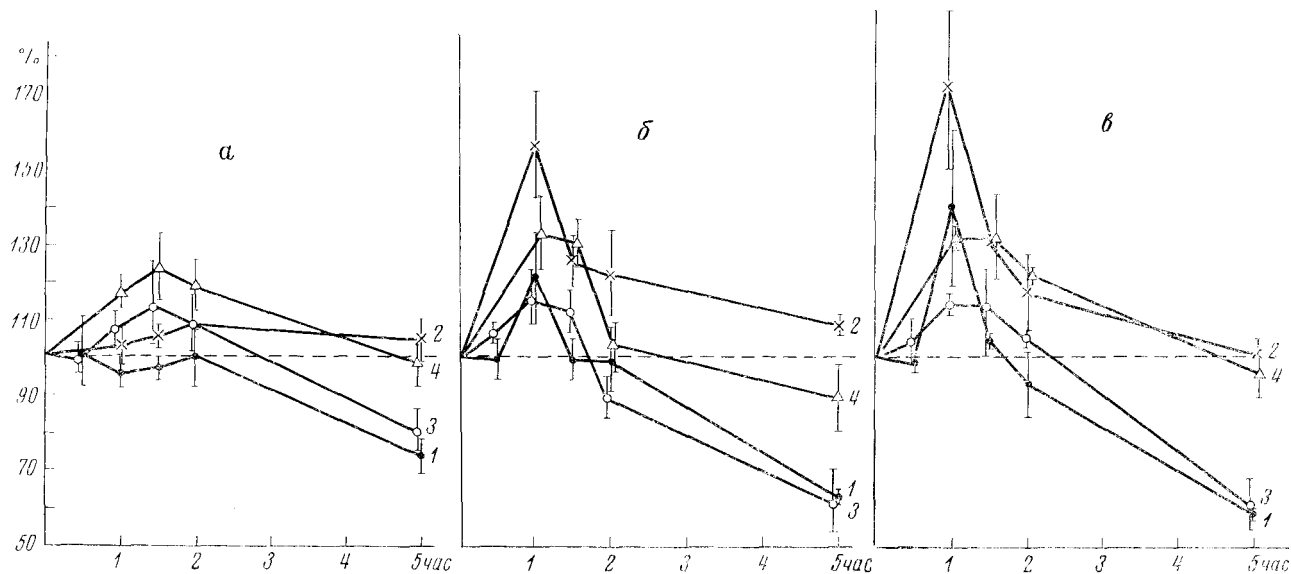


Рис. 2. Влияние облучения изолированных тимоцитов и крыс в дозах 250 р (а), 500 р (б), 1000 р (в) на активность фосфодиэстеразы 3',5'-цАМФ в различные сроки после облучения. Состав инкубационных проб для определения ферментативной активности (0,3 мл):  $8^{14}\text{C}$ -3',5'-цАМФ  $1,57 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  ( $15-30 \cdot 10^3$  имп/мин);  $\text{MgCl}_2$   $8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ; трис- $\text{HCl}$   $4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , pH 7,8; 0,15 мг белка. Инкубация 5 мин. при  $37^\circ$ . Изменение активности фермента выражено в процентах от контроля: изменение активности фермента в опытах *in vitro*, рассчитанное на 1 мг белка (1) и на число живых клеток (2); изменение активности фермента в опытах *in vivo*, рассчитанное на 1 мг белка (3) и на число живых клеток (4)

1 час после облучения не исчезает. Таким образом, можно думать, что активация не связана с ускорением синтеза фермента. Можно предположить, что этот эффект вызван конформационными перестройками в молекуле фермента после облучения.

Исследование влияния облучения *in vitro* в дозе 1000 р лизата клеток, как без предварительного диализа, так и подвергнутого диализу для освобождения от низкомолекулярных эндогенных соединений, не показало изменения активности фосфодиэстеразы, спустя 0,5–2 часа после облучения. Таким образом, можно думать, что если активация фермента не связана с конформационными изменениями молекулы, то эффект не вызван прямым воздействием радиации или изменениями концентрации в облученных клетках каких-либо метаболитов, влияющих на активность фосфодиэстеразы. Очевидно, для активации фермента необходимо сохранение целостности клетки или клеточных мембран.

Результаты этих опытов дают основание предполагать, что фонд эндогенного цАМФ через 1 час после облучения может быть снижен в результате активации фосфодиэстеразы. При этом следует учитывать большую активность этого фермента по сравнению с аденилатциклазной активностью (<sup>7</sup>, <sup>8</sup>). Так как цАМФ, являясь медиатором действия многих полипептидных гормонов и катехоламинов, служит важным регуляторным звеном клетки, можно думать, что изменение внутриклеточного фонда этого нуклеотида в ранние сроки после облучения будет иметь важные последствия для развития лучевого поражения клетки и организма.

Институт биофизики  
Министерства здравоохранения СССР  
Москва

Поступило  
30 I 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> H. M. Patt, *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, v. 59, Art. 4, 649 (1955). <sup>2</sup> T. Yamaguchi, *Intern. J. Rad. Biol.*, v. 12, 3, 235 (1967). <sup>3</sup> H. Langendorff, *Strahlentherapie*, v. 140, 428 (1970). <sup>4</sup> H. Langendorff, M. Langendorff, *Intern. J. Rad. Biol.*, v. 19, 493 (1971). <sup>5</sup> H. Langendorff, M. Langendorff, *Strahlentherapie*, v. 143, 432 (1972). <sup>6</sup> E. De Robertis, G. K. L. Arnaiz et al., *J. Biol. Chem.*, v. 242, 15, 3487 (1967). <sup>7</sup> W. Y. Cheung, In: *Role of Cyclic AMP in Cell Function*, v. 3, N. Y., 1970, p. 51. <sup>8</sup> W. Y. Cheung, *Perspect. in Biol. and Med.*, v. 15, 224 (1972). <sup>9</sup> M. G. Ormerod, U. Stevens, *Biochim. et biophys. acta*, v. 232, 72 (1971).