

УДК 577.391:577.024.577.082

БИОХИМИЯ

А. С. СОБОЛЕВ, А. Н. ОРЕХОВ, Ю. Ю. ЧИРКОВ,
Ю. Б. КУДРЯШОВ

**ДЕЙСТВИЕ РАДИОПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
НА УРОВЕНЬ ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИН-3',5'-МОНОФОСФАТА
(цАМФ), АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ
И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ цАМФ**

(Представлено академиком Г. М. Франком 11 V 1975)

В последние годы получен большой фактический материал, свидетельствующий о том, что введение в организм радиопрофилактических веществ вызывает глубокие биохимические перестройки, способствующие повышению устойчивости организма к облучению (¹⁻⁴). Одним из результатов работ в этом направлении является концепция «биохимического фона повышенной радиорезистентности», согласно которой защитное действие противолучевых средств связано с накоплением в органах и тканях эндогенных радиопротекторов (серотонина, гистамина и дофамина) и уменьшением содержания и активности эндогенных радиосенсибилизаторов (²). Известно, что в противолучевом эффекте центральное место занимает защита от понижающей радиации процессов синтеза ДНК, клеточного деления и других радиочувствительных процессов (^{4, 5}), но именно они, как показано (^{6, 7}), находятся под контролем цАМФ. В связи с этим представляет большой интерес предположение о том, что биохимические изменения, вызванные в организме введением противолучевых веществ, являются следствием воздействия радиопротекторов на систему цАМФ (³). Согласно этой гипотезе, радиозащитные амниотиолы связываются рецепторами аденилатциклазы, что вызывает активацию этого фермента и синтез цАМФ, который и инициирует в клетке процессы, приводящие к повышению ее устойчивости к радиации. Однако прямых подтверждений это предположение еще не получило, хотя участие цАМФ в защитном действии протекторов было обнаружено в некоторых исследованиях (^{8, 9}). Поэтому данная работа посвящена изучению действия радиозащитных средств на уровень цАМФ, на активность ферментов, регулирующих его (аденилатциклазы и фосфодиэстеразы), в радиочувствительной ткани — тонкой кишке крыс.

Эксперименты были проведены на самцах крыс Вистар (весом 150—180 г). Метод исследования аденилатцикласной активности состоит в следующем (¹⁰). Грубую мембранную фракцию слизистой тонкой кишки лн-кубировали 3—5 мин. в среде (0,4 мл), состоящей из 1 мМ АТФ, 5 мМ MgSO₄ в 50 мМ трис-HCl-буфере pH 7,4, содержащем 10 мМ кофеин, систему регенерации АТФ (125 мкг/мл пируваткиназы и 5 мМ фосфоенолпируват) и 0,5 мкС ¹⁴C-АТФ; для учета потерь добавляли 2·10⁻⁶ М цАМФ и 20 000 имп/мин ³H-цАМФ. После окончания реакции и отделения белка смесь разделяли с помощью электрофореза на бумаге FN-17 (ГДР) (буфер: 40 мМ триэтиламин — CO₂ pH 9,0, 90 мин, 35 в/см) и последующей хроматографии на бумаге (1 М ацетат аммония: этанол 3:7, 20 час). Пятно с цАМФ вырезали, помещали в стандартный флакон и считали двойную метку ³H/¹⁴C на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Mark-II» («Nuclear Chicago», США). Активность аденилатциклазы выражали в пмоль образовавшегося цАМФ на 1 мг белка за 1 мин. инкубации при 37°.

фосфодиэстеразу цАМФ из цитозоля слизистой тонкой кишки крыс выделяли по Чейзину и Харрису (¹¹). Инкубационная смесь (0,3 мл) состояла из 0,2 мкМ цАМФ, 1 мМ MgSO₄ в 60 мМ три-НСI-буфере рН 8,0, содержащем 0,1 мкС ³Н-цАМФ. После 15-минутной инкубации (скорость гидролиза цАМФ фосфодиэстеразой слизистой тонкой кишки постоянна по

Таблица 1

Влияние радиопротекторов на активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы цАМФ слизистой тонкой кишки крыс

Радиопротектор	Концентрация, М	Активность пмол. образ. цАМФ на 1 мг белка в 1 мин.	P
----------------	-----------------	---	---

Аденилаткиназа

Контроль (базальная активность)	—	42,6±1,9	—
АЭТ	5·10 ⁻³	36,7±3,2	>0,1
МЭА	5·10 ⁻³	41,7±8,5	>0,1
Серотонин	5·10 ⁻⁴	66,5±6,7	<0,01
Гистамин	5·10 ⁻⁴	68,4±6,8	=0,01
Дофамин	5·10 ⁻⁴	81,4±7,4	<0,001
Серотонин	5·10 ⁻⁵	64,5±9,8	<0,05
Гистамин	1·10 ⁻⁴	60,6±5,9	<0,01
Дофамин	1·10 ⁻⁴	55,3±5,4	<0,05

Фосфодиэстераза цАМФ

Контроль	—	10,5±0,3	—
АЭТ	5·10 ⁻³	12,3±0,6	<0,05
МЭА	5·10 ⁻³	11,9±0,5	<0,05
Серотонин	5·10 ⁻⁴	10,0±0,4	>0,1
Гистамин	5·10 ⁻⁴	10,7±0,2	>0,1
Дофамин	5·10 ⁻⁴	10,6±0,4	>0,1

Таблица 2

Уровень цАМФ в тонкой кишке крыс через 15 мин. после внутрибрюшинного введения радиопротекторов

Радиопротектор	Доза, мг/кг	Концентрация цАМФ, пмол/мг	% от контроля	P
----------------	-------------	----------------------------	---------------	---

Контроль	—	1,3±0,1	—	—
АЭТ Вг-НВг	250	1,8±0,1	139	<0,01
МЭА ботартрат	400	1,7±0,1	131	<0,01
Серотонин креатинин-сульфат	60	2,2±0,02	170	<0,01
Гистамин основание	106	2,0±0,1	154	<0,01
Дофамин гидрохлорид	90	1,7±0,1	131	<0,01

крайней мере в течение первых 30 мин.), внесения спиртового раствора св-детелей (аденозин цАМФ и 5'-АМФ) и депротенинизации хлороформом водную фазу наносили на бумагу FN-17 и подвергали электрофорезу как описано выше. Полоски, содержащие аденозин, цАМФ и 5'-АМФ, вырезали, элюировали водой и считали активность ³Н элюата в жидком сцинтиляторе Брея. По полученным данным рассчитывали степень гидролиза цАМФ и затем активность фосфодиэстеразы, выражаемую в пмолях гидролизованного цАМФ на 1 мг белка за 1 мин. инкубации при 37°.

Экстракцию цАМФ из тонкой кишки проводили по методу Цанга и др. (¹²). Концентрацию цАМФ в пробах определяли методом изотопного раз-

бавления (¹³), используя наборы фирмы «Amersham» (Великобритания). Содержание цАМФ в тонкой кишке выражали в пмольях цАМФ на 1 мг сырого веса ткани.

Проведенные эксперименты показали, что радиозащитные агенты, принадлежащие к тиольным радиопротекторам: S, β-аминоэтиллизотиуроний (АЭТ) и 2-меркаптоэтиламин (МЭА) в радиозащитных концентрациях ($5 \cdot 10^{-3}$ M) практически не влияют на активность аденилатциклазы слизистой тонкой кишки крыс (табл. 1, строки 2, 3). В отличие от них радиопротекторы из класса биогенных аминов (серотонин, гистамин и дофамин) в радиозащитных концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ M) в 1,5–2 раза активируют аденилатциклазу (табл. 1, строки 4–6). Все исследуемые противолучевые средства слабо влияют, либо совершенно не оказывают действия на активность фосфодиэстеразы (табл. 1). Незначительная активация фосфодиэстеразы тиолами, по-видимому, обусловлена восстановлением SH-групп фермента, что подтверждается нашими опытами с «состарившимися» препаратами фосфодиэстеразы, где АЭТ и МЭА восстанавливали активность его почти до нормальных значений (данные не приводятся).

В то же время все исследованные радиопротекторы вызывают значительный подъем содержания цАМФ в тонкой кишке крыс ко времени максимальной защиты (табл. 2). Увеличение уровня цАМФ под действием радиозащитных тиолов в отсутствие эффекта активации тиолами аденилатциклазы и ингибирования фосфодиэстеразы кажется на первый взгляд парадоксальным. Однако оно может быть объяснено, если принять во внимание: 1) что аденилатциклаза может быть активирована не только гормонами, но и биогенными аминами (¹⁴) и 2) что радиопротекторы, в том числе тиолы, стимулируют синтез биогенных аминов (серотонина, гистамина, а также дофамина (²) и других катехоламинов (¹⁶)), в результате чего наблюдается увеличение содержания их в клетках и тканях, причем в тонкой кишке крыс до 10^{-4} M для дофамина и гистамина и до $5 \cdot 10^{-5}$ M для серотонина. Биогенные амины в этих концентрациях также активируют аденилатциклазу (табл. 1, строки 7–9), так что подъем уровня цАМФ в тонкой кишке крыс (настоящее сообщение) и в печени мышей (³) после введения радиозащитных тиолов, по-видимому, опосредован биогенными аминами.

Основываясь на этих результатах и на экспериментальном материале, полученном в обоснование гипотезы «биохимического фона радиорезистентности» (²), можно предположить, в качестве рабочей гипотезы, следующую последовательность начальных событий: 1) радиопротектор из класса амфотиолов активирует синтез биогенных аминов, 2) введенные и (или) эндогенно синтезированные амины связываются рецепторами аденилатциклазы, 3) аденилатциклаза активируется, 4) в клетке возрастает концентрация цАМФ, 5) цАМФ активирует протеинкиназы (рис. 1). Дальнейшие же этапы этого процесса еще не ясны, известны лишь конечные эффекты, часть которых перечислена во введении. Один из таких эффектов — увели-

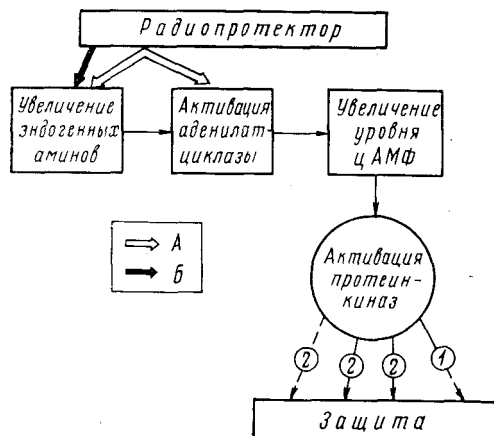


Рис. 1. Предполагаемая схема механизма действия радиопротектора через систему цАМФ. Пути проявления эффектов радиопротекторов: А — аминного типа, Б — тиольного типа. 1 — активация дисульфидредуктаз (¹⁶) и увеличение уровня SH-групп (¹), 2 — другие возможные эффекты

чение под влиянием радиопротекторов уровня эндогенных тиолов ⁽¹⁾ — может найти объяснение и в рамках предлагаемой схемы с привлечением экспериментальных данных ⁽¹⁶⁾, где показано, что увеличение уровня SH-групп дисульфидредуктазами опосредуется через цАМФ и протеинкиназы (рис. 1).

В настоящее время нами проводятся исследования, направленные на выяснение справедливости высказанного предположения, а также роли системы цАМФ в радиорезистентности и лучевом поражении.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Получено:
14 V 1977

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Э. Я. Граевский, Сульфгидрильные группы и радиочувствительность. М., «Атомиздат», 1969. ² Ю. Б. Кудряшов, Е. Н. Гончаренко, В кн.: Современные проблемы радиобиологии, т. 4, М., «Атомиздат», 1975, стр. 269. ³ H. Langendorff, Strahlentherapie, B. 140, 428 (1970). ⁴ Е. Ф. Романцев, Радиация и химическая защита, М., «Атомиздат», 1968. ⁵ P. Eker, A. Pihl, Radiation Res., v. 21, 165 (1964). ⁶ W. Frank, Exp. Cell Res., v. 71, 238 (1972). ⁷ J. Often, G. S. Johnson, I. Pastan, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 44, 1192 (1971). ⁸ P. Mitznegg, Intern. J. Radiat. Biol., v. 24, 339 (1973). ⁹ T. L. Pazdernik, E. M. Uyeki, Federat. Proc., v. 33, 521 (1974). ¹⁰ А. Н. Орезов, А. С. Соболев, Ю. Ю. Чирков, Биол. науки, № 9 (1975). ¹¹ M. Chasin, D. N. Harris, In: Methods in Cyclic Nucleotide Research, N. Y., 1972, p. 169. ¹² C. P. W. Tsang, D. C. Lehotay, B. E. P. Murphy, J. Clin. Endocrinol. and Metabol., v. 35, 809 (1972). ¹³ K. C. Tovey, K. G. Oldham, J. A. M. Whelm, Clin. chim. acta, v. 56, 221 (1974). ¹⁴ G. A. Robinson, R. W. Butcher, E. W. Sutherland, Cyclic AMP, N. Y., 1971. ¹⁵ В. И. Кулинский, Обмен биогенных моноаминов у облученных животных и механизмы радиозащитного эффекта. Автореф. докт. дисс., М., 1970. ¹⁶ В. И. Кулинский, В. В. Иванов, ДАН, т. 213, 1439 (1973).