

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.391; 611.783

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА АКТИВНІСТЬ Mg^{2+} -АТФази ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ**Г.В.Зима, В.І.Древаль***Харківський державний університет Пл.Свободи, 4, Харків 310077*

Надійшла до редакції 14 травня 1998 р.

Вивчено змінювання активності Mg^{2+} -АТФази при порівнянні впливу іонізуючого випромінювання у діапазонах малих та великих доз (від $4 \cdot 10^{-3}$ до 10^3 Гр) на суспензію плазматичних мембран еритроцитів. Визначали константу Міхаеліса та максимальну швидкість ферментативної реакції. Встановлено, що різке зростання активності Mg^{2+} -АТФази при дозах 1 Гр та 10^3 Гр пов'язано із змінюванням спорідненості субстрату до активного центра ферменту та швидкості розпаду фермент-субстратного комплексу. Отримані дані дозволяють передбачати, що ефект іонізуючої радіації на Mg^{2+} -АТФазу при дозі 1 Гр обумовлений дією продуктів радіолізу води, а при дозі 10^3 Гр - комбінованим впливом прямої та посередньої дії радіації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Іонізуюче випромінювання, плазматична мембрана еритроцита, Mg^{2+} -АТФаза.

Розширення сфери використання іонізуючих випромінювань, а також необхідність об'єктивних оцінок реальних радіобіологічних досліджень радіаційних уражень робить вивчення молекулярного механізму біологічної дії радіації однією з центральних проблем радіаційної біофізики. У діапазоні малих доз дозозалежною величиною є тільки кількість уражених клітин, а гетерогенність біологічних структур обумовлює формування гетерогенності поглинаємих різними структурами доз, та розподілення енергії внаслідок фізично значущих ефектів стохастичної природи [1]. При великих дозах радіаційно-індуковані зміни відносяться до нестохастичних. Тому виникає питання про коректність прямої екстраполяції даних про ефекти, які були виявлені після опромінення так званими великими дозами на діапазон малих доз, з метою отримання оцінок радіобіологічних ризиків при такого рода впливах. У ролі загального механізму, який пояснює ефект малих та великих доз радіації, передбачається порушення радіацією функцій плазматичної та внутрішньоклітинної мембрани [2]. Але в літературі відсутні дані про порівнювальний вплив малих та великих доз радіації на біомембрани. Можна вважати, що у кооперативній системі білок-ліпідного матрикса мембран радіаційно-індуковані порушення структури мембран ведуть до зміни структурно-функційних властивостей інтегральних білків. Деякою мірою оцінити це можна, досліджуючи кінетичні характеристики мембранозв'язаних ферментів. У зв'язку з цим ми провели дослідження дії іонізуючого випромінювання у широкому дозовому інтервалі на активність Mg^{2+} -АТФази плазматичних мембран еритроцитів.

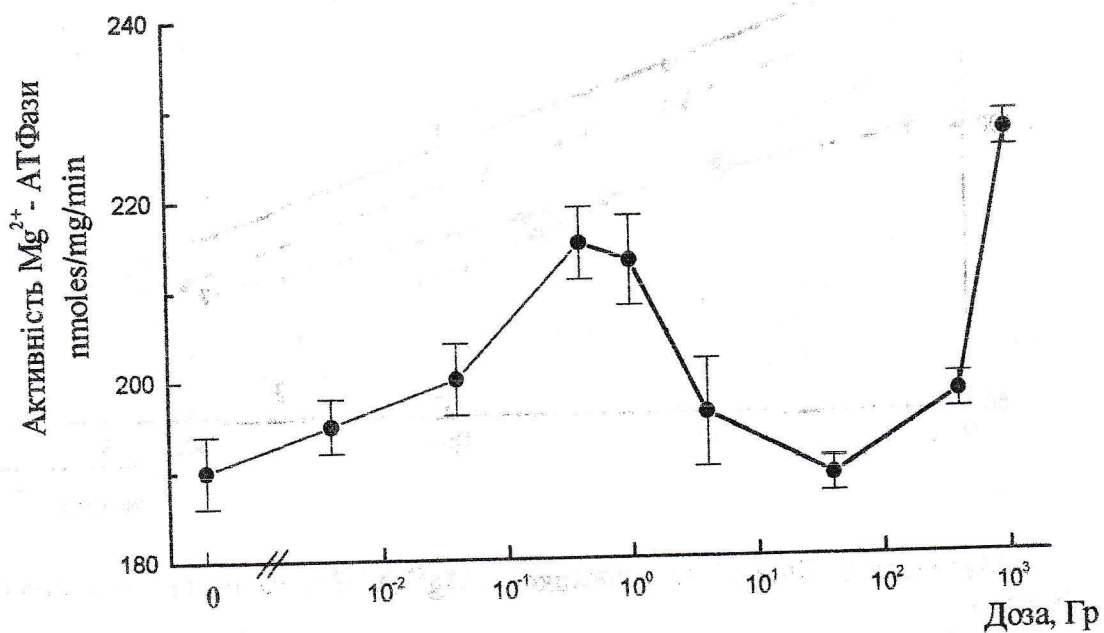
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.

В роботі використовували плазматичні мембрани еритроцитів донорської крові [3]. Активність Mg^{2+} -АТФази визначали, як докладно описано раніше [4]. Суспензію плазматичних мембран еритроцитів (3,5 мг білка/мл) опромінювали у дозах $4 \cdot 10^{-3}$ Гр - 0,4Гр на рентгенівській установці РУМ-17, а в дозах 1Гр- 10^3 Гр на гамма-установці "Досліджувач" (^{60}Co). Концентрацію білка визначали мікробиуретовим методом [5]. Статичну обробку результатів проводили за методом [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

Можна бачити (Мал.1), що при дії іонізуючого випромінювання у дозі 1Гр активність Mg^{2+} -АТФази зростає у 3,52 рази ($p < 0,05$) порівняно з неопроміненим контролем. При збільшенні дози радіації до 40Гр активність Mg^{2+} -АТФази знижується до рівня контролю, а при опроміненні у дозі 10^3 Гр зростає у 4,68 рази ($p < 0,05$) порівняно з неопроміненими мембранами.

Разом з тим, як уже відзначалось раніше [4], визначення активності ферменту само по собі є мало інформативним, тому що активність Mg^{2+} -АТФази розглядається за сумарною кількістю неорганічного фосфату, який відщепився.



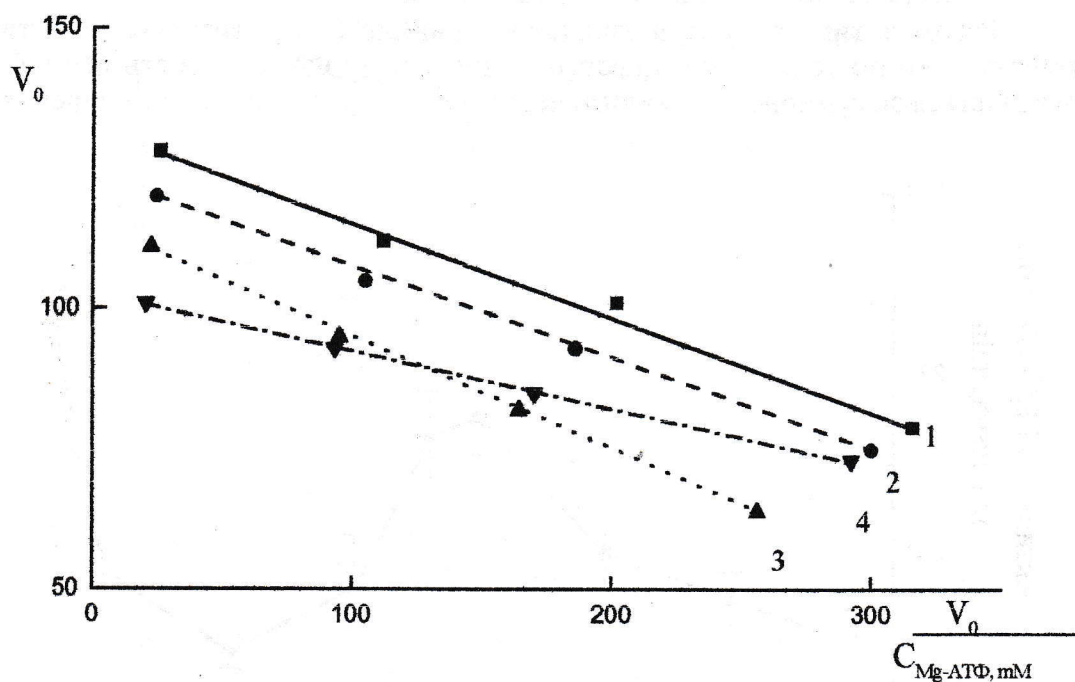
Малюнок 1. Вплив іонізуючого випромінювання на активність Mg^{2+} -АТФази.

Тому були проведені визначення кінетичних параметрів ферментативної реакції. Визначення кінетичних параметрів Mg^{2+} -АТФазної реакції проводили за методом Іді-Хофсті [7] (Мал.2). Результати визначення константи Міхаеліса (K_m) та максимальної швидкості ферментативної реакції (V_{max}) представлені в Таблиці 1. Можна бачити, що у всьому досліджуваному дозовому інтервалі, при збільшенні дози радіації V_{max} зменшується, що указує на зменшення константи швидкості розпаду фермент-субстратного комплексу з утворенням продуктів реакції [8]. Поряд з цим K_m при опроміненні у дозі 1Гр та 10^3 Гр зменшується на

6% та 39%, відповідно, а при дозі 40Гр зростає на 14% порівняно з неопроміненим контролем. Отримані дані дозволяють висновувати, що при дозі 40Гр структурні зміни ферменту приводять до зменшення спорідненості субстрату $Mg\text{-ATP}^{2-}$ до активного центра ферменту, а при дозах 1Гр та 10^3 Гр - до збільшення спорідненості субстрату до активного центра $Mg^{2+}\text{-ATP}$ фази.

Таблиця 1. Змінювання константи Міхаеліса та максимальної швидкості ферментативної реакції при дії іонізуючої радіації

Доза, Гр	Параметр	V_{max} , нмоль Φ_H мг білка ⁻¹ min ⁻¹	K_m , mM
0		133,2	0,172
1		123,6	0,161
40		115,7	0,196
10^3		103,1	0,105

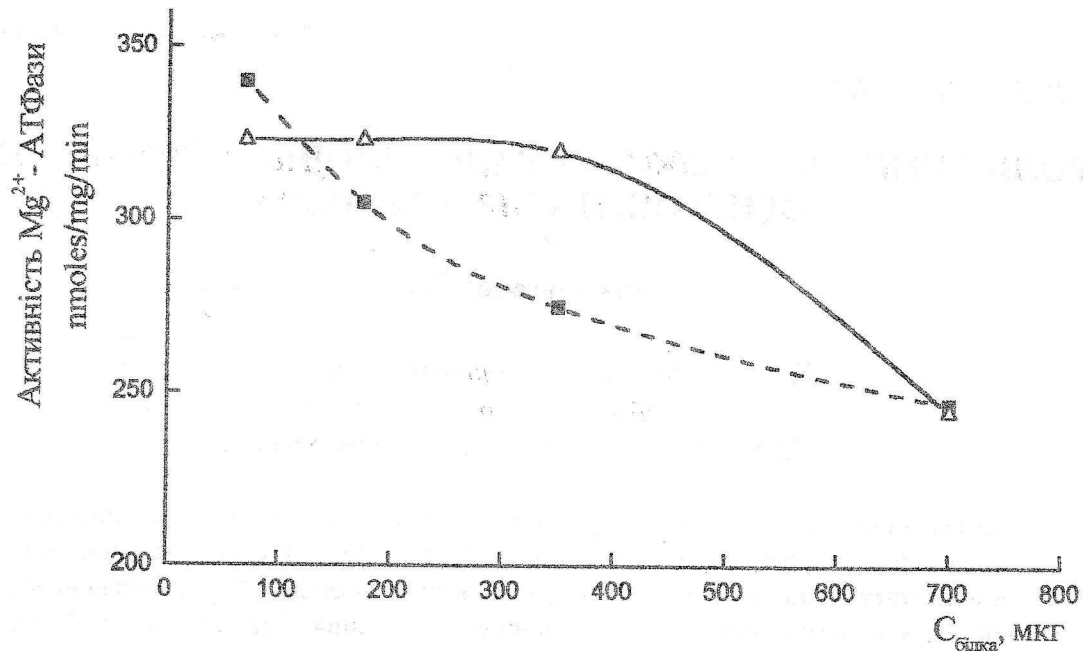


Малюнок 2. Лінеаризація швидкості $Mg^{2+}\text{-ATP}$ асної реакції в координатах Іді-Хофсті.

Позначення: 1-контроль; 2-1Гр; 3-40Гр; 4- 10^3 Гр,

V_0 - активність $Mg^{2+}\text{-ATP}$ фази, nmoles/mg/min.

Очевидно зміни, які спостерігаються пов'язані з конформаційними перебудовами молекул $Mg^{2+}\text{-ATP}$ фази, що може бути обумовлено як прямою дією іонізуючої радіації на молекули білків, так і результатом дії продуктів радіолізу води [9]. З метою оцінити механізм впливу іонізуючої радіації на $Mg^{2+}\text{-ATP}$ азу досліджували зміну активності опромінюваного ферменту у залежності від розведення препарату мембран (Мал.3). Можна бачити, що при діянні іонізуючої радіації у дозі 1Гр основний внесок роблять продукти радіолізу води, тоді як при опроміненні у дозі 10^3 Гр $Mg^{2+}\text{-ATP}$ фази має місце сполучений вплив прямої дії іонізуючої радіації та продуктів радіолізу води.



Малюнок 3. Вплив розведення на активність Mg^{2+} -АТФази при опроміненні у дозі 1Гр(1) та 10^3 Гр(2).

ВИСНОВКИ

Встановлено, що вплив іонізуючої радіації у дозах $4 \cdot 10^3 - 10^3$ Гр на плазматичні мембрани еритроцитів приводять до статистично значущих збільшень активності Mg^{2+} -АТФази при дозах 1Гр та 10^3 Гр, які супроводжуються структурними змінами активного центра ферменту. При цьому радіаційно-індуковані зміни активності Mg^{2+} -АТФази при дозі 1Гр зумовлені продуктами радіолізу води, а при дозі 10^3 Гр - комбіновани впливом прямої та посередньої дії радіації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.

1. Спитковский Д.М., Зайцев С.Б., Тальзина Е.А. // Радиобиология, 1994, Т.34, № 6, С.739-747.
2. Эйбус Л.Х. // Радиобиология, 1994, Т.34, № 6, С.748-758.
3. Dodje J, Mithell C., Nahahan D. // Arch. Biochem. Biophys. 1963, V.100, P.119-130.
4. Древаль В.И., Гирнык С.А. // Биофизика, 1990, Т.35, № 4, С.87-89.
5. Бэйли Дж. Методы химии белков М.:Мир, 1965, 284с.
6. Кокунин В.А. // Укр.биохим. журн., 1975, Т.47, №5, С.776-791
7. Klotz I.M., Hunston D.L. // Biochemistry, 1971, V.10, № 16, P. 3065-3068
8. Диксон М., Уэбб Э, Ферменты, т.1, М.Мир, 1982, с. 99
9. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Радиационная биофизика М.: Изд-во МГУ, 1979, 240 с.