

Биология

УДК 577.1. 612-014.482

А. А. АСОЯН, П. А. КАЗАРЯН, А. Р. ЕГИАЗАРЯН, А. А. ПЕПАНЯН

**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ
ПРИ ИОНИЗИРУЮЩЕМ ОБЛУЧЕНИИ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ
4-БУТАНОЛИДА ВАС-167**

Установлено, что воздействие ионизирующей радиации характеризуется статистически достоверным снижением концентрации АТФ и резким повышением уровня АМФ в эритроцитах крови, сопровождающимися значительными изменениями отношений АТФ/АДФ, АТФ/АМФ и энергетического заряда. После применения производного 4-бутанолида ВАС-167 отмечается выраженная тенденция к нормализации всех изученных показателей, свидетельствующая об определенной биологической активности данного соединения.

Введение. Расширение контактов человека с источниками ионизирующей излучений (атомные электростанции, промышленные предприятия, лечебные учреждения и др.) ставит перед современной радиационной биохимией и медицинской радиологией задачу поиска и изучения биологически активных веществ, обладающих защитными и лечебными эффектами при радиационном воздействии [1–3].

Общеизвестно, что радиоактивные элементы, попадая в организм, уже через несколько минут обнаруживаются в крови и приводят к определенным изменениям показателей периферической крови. Эти изменения сохраняются в течение многих лет и проявляются в виде количественных сдвигов, чаще с тенденцией к снижению уровня основных показателей периферической крови. Важным фактором лучевого поражения является также снижение жизнеспособности кровяных клеток (эритроцитов, тромбоцитов), что усиливает напряженность гемопоэза. В связи с этим исследование гематологических и метаболических нарушений в различные сроки после облучения имеет очень важное диагностическое значение [4]. Вместе с тем известно, что в развитии различных патологических состояний значительное место занимают нарушения биоэнергетических процессов, определяющих интенсивность внутриклеточных реакций и координирующих метаболизм клетки [5, 6].

Важным звеном клеточного метаболизма является адениловая система, определяющая интеграцию процессов выработки энергии с множеством внутриклеточных энергопотребляющих реакций. В этом плане эритроциты

являются удобным, легкодоступным объектом для изучения метаболизма аденилатов, в частности, их внутриклеточной регуляции как важнейших показателей энергетического метаболизма [7, 8]. Наряду с этим эритроциты находятся в тесной функциональной связи с соматическими клетками, и по напряженности внутриэритроцитарных реакций, определяемых состоянием адениловой системы, можно судить об уровне функционирования клеток различных органов и тканей [9].

На основании вышеизложенного для выяснения глубины патологических изменений при радиационном стрессе и эффективности терапии целесообразно всесторонне изучить состояния энергетического обмена эритроцитов при радиационном стрессе и после применения нового производного 4-бутанолида, обладающего определенной биологической активностью [10].

Методы исследования. Опыты проводились на 45 белых крысах-самцах массой 160–180 г. Подопытные животные подвергались однократному облучению в дозе 3 Гр при помощи аппарата РУМ-17; фокусное расстояние 60 см, мощность дозы 0,26 Гр/мин. Соединение ВАС-167, синтезированное на кафедре органической химии химического факультета ЕГУ, вводилось внутрибрюшинно в виде 2%-го раствора в течение 3-х дней по 1-ой инъекции в день из расчета 10 мг на 1 кг массы. Животные забивались на 10-ые сутки после облучения методом декапитации.

Адениловые нуклеотиды экстрагировались в 6%-ой хлорной кислоте [11]. В исследованиях использовались эритроциты крови. Фракционирование нуклеотидов осуществлялось методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля марки «Мерк» (Англия). Для разделения адениловых нуклеотидов использовалась система растворителей диоксан–аммиак–вода (4:2:1) [12]. Идентификация адениловых нуклеотидов проводилась с помощью стандартов (свидетелей) фирмы «Sigma». Для обнаружения нуклеотидов пластинку помещали в йодовую камеру, затем соответствующие зоны силикагеля переносили в пробирки, добавляли 0,15 мл 60%-ой хлорной кислоты и проводили сжигание в песчаной бане при 180⁰С до полного обесцвечивания. В охлажденных пробирках определялось содержание неорганического фосфора [13]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия достоверности и различий Фишера–Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Проведенные нами исследования показали, что воздействие ионизирующей радиации характеризуется существенными изменениями содержания адениловых нуклеотидов в эритроцитах крови (см. рисунок). Так, в условиях облучения выявлено 55%-ое снижение уровня основного макроэрга АТФ, сопровождающееся статистически достоверным повышением моно- (АМФ) и дифосфорных (АДФ) производных аденозина соответственно на 46% и 69%. При этом наблюдается незначительное понижение суммы адениловых нуклеотидов (САН). Указанные изменения являются свидетельством нарушения метаболизма аденилатов.

Перераспределение между АТФ, АДФ и АМФ определяет изменение энергетического заряда (ЭЗ), эквивалентного величине относительной концентрации АТФ. После воздействия радиации величина ЭЗ снижается на 20%

по сравнению с нормой, что свидетельствует о недостаточном заполнении адениловой системы макроэргическими связями. В свою очередь, эти изменения приводят к более чем двукратному уменьшению показателей энергетического обмена АТФ/АДФ и АТФ/АМФ при одновременном более существенном уменьшении коэффициента K – показателя соотношения прямых и обратных процессов преобразования АДФ в аденилаткиназной реакции (см. таблицу). Полученные данные характеризуют особенности адениннуклеотидного обмена, связанного с глубоким влиянием многокомпонентных факторов радиационного поражения на активность энергопродуцирующих процессов в клетках. Их недостаточность, по-видимому, определяет низкий уровень энергообеспечения и соответствующую неполноценность функционирования кислородтранспортных систем эритроцитов [14]. Синтез адениловых нуклеотидов сопряжен с многочисленными метаболическими циклами, в том числе с процессами окислительного фосфорилирования и гликолизом.

Изменение соотношений адениловых нуклеотидов в эритроцитах периферической крови при радиационном стрессе и после введения 4-бутанолида ВАС-167

Отношение адениловых нуклеотидов	Норма (n=13)	После облучения (n=14)	После введения 4-бутанолида (n =12)	P ₁	P ₂	P ₃
АТФ/АДФ	2,38±0,10	1,0±0,06	2,1±0,07	<0,01	<0,01	>0,5
АТФ/ АМФ	7,09±0,11	3,3±0,09	7,69±0,15	<0,001	<0,01	>0,5
ЭЗ	0,78±0,03	0,65±0,03	0,77±0,05	<0,05	>0,05	>0,5
K	0,80±0,05	0,30±0,03	0,57±0,04	<0,001	<0,01	<0,05

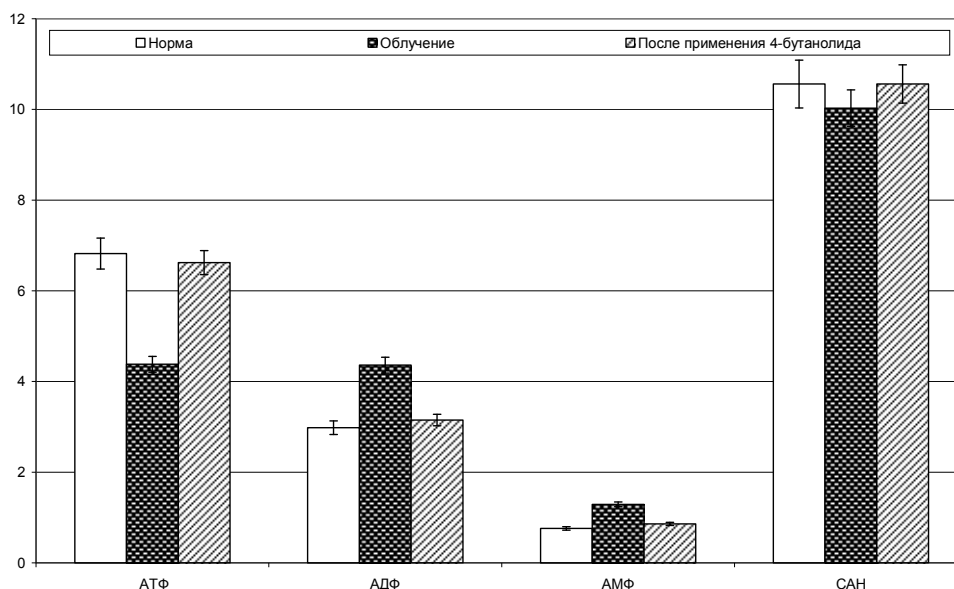
Примечание: P₁, P₂, P₃ – достоверности данных после облучения по сравнению с нормой, после введения 4-бутанолида по сравнению с облучением и после введения 4-бутанолида по сравнению с нормой соответственно.

Итак, обнаруженные нами отклонения в энергетическом балансе указывают на степень метаболических нарушений при радиационном стрессе, характеризующих изменения соотношений ферментативных процессов фосфорилирования и дефосфорилирования макроэргов [5]. Недостаток макроэргического фосфата может привести к серьезным нарушениям, а именно: к деэнергизации систем активного транспорта ионов, росту осмотической резистентности, падению мембранной деформируемости, а в результате – к уменьшению продолжительности жизни эритроцитов [9].

Нет сомнений, что подавление энергетической регуляции обменных процессов приводит к нарушениям гомеостаза и реализации функциональных связей в пострadiационном периоде. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на изыскание новых средств, способствующих нормализации энергетического метаболизма при радиационном стрессе. С этой целью нами были проведены исследования влияния соединения 4-бутанолида ВАС-167 на показатели метаболизма адениловых нуклеотидов после воздействия радиации.

Как показали результаты проведенных нами исследований, под воздей-

ствием ВАС-167 наблюдаются существенные положительные сдвиги в энергетическом метаболизме клетки в пострadiационный период (см. рисунок).



Влияние 4-бутанолида на содержание адениловых нуклеотидов в эритроцитах крови при радиационном стрессе (в $\mu\text{M}/\text{мл}$).

В частности, уровень АТФ почти полностью восстанавливается и составляет $6,62 \pm 0,17$ против контрольного $6,82 \pm 0,21$, что, по-видимому, связано с нормализацией интенсивности гликолитических процессов, являющихся основным путем образования макроэргического фосфата в эритроцитах. Повышение концентрации АТФ на фоне определенной нормализации содержания АМФ и АДФ сопровождается восстановлением адениннуклеотидного пула (САН) в эритроцитах после применения препарата. Вместе с тем изменения в содержании адениловых нуклеотидов приводят к резкому увеличению (на 133%) отношения АТФ/АМФ, характеризующего метаболические сдвиги энергобаланса – синтеза и утилизации АТФ. Об усилении синтеза макроэрга в аденилаткиназной реакции убедительно свидетельствует почти двукратное повышение K . При этом отношение АТФ/АДФ также значительно повышается (на 110%), что является отражением определенной нормализации состояния биоэнергетики в клетке. О регуляции энергетического метаболизма под влиянием производного 4-бутанолида свидетельствует и стабилизация ЭЗ.

Таким образом, благоприятное влияние соединения ВАС-167 на течение пострadiационного периода ведет к существенной нормализации в системе адениловых нуклеотидов эритроцитов крови. Это может быть обусловлено как улучшением тканевых окислительно-восстановительных процессов, усилением сопряжения окисления с фосфорилированием, так и ингибированием процессов распада нуклеозидтрифосфатов.

Кафедра органической химии и
кафедра фармацевтической химии ЕГУ
Гематологический центр МЗ РА

Поступила 04.06.2007

ЛИТЕРАТУРА

1. Shishkina L.N., Kushnireva E.V., Smotrieva M.A. – Radiats. Biol. Radioecol., 2004, v. 44, № 3, p.289–295.
2. Оганесян Н.М. Медицинские последствия радиационных аварий. Ер.: Гитутюн, 2000, 127с.
3. Казарян П.А., Казарян А.П., Асоян А.У., Галоян А.А. – Кровь, 2005, т. 1, № 1, с. 23–35.
4. Суворова Л.А. – Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2000, №1, с. 67–75.
5. Нагиев Э.Р., Газимагомедова М.М. – Биомедицинская химия, 2003, т. 49, №2, с. 138–144.
6. Сейфадинова М.С., Луговец В.М., Арбуханова М.С., Исмаилов И.А., Сыпченко В.И., Нагиев Э.Р. Mat. VII Межд. конф. по теме «Циклы», Ставрополь, 2005, т. 3, с. 112–115.
7. Delaney S.M., Geiger J.D. – Neurosci. Methods, 1996, v. 64, № 2, p. 151–156.
8. Falgoutyret J.P., Denis D., Macdonald D. et al. – Gen. Physiol., 1999, v. 114, № 1, p. 55–70.
9. Васильева Е.М. – Биомедицинская химия, 2005, т. 51, вып. 2, с. 118–126.
10. Арутюнян В.С., Кочикян Т.В., Аветисян А.А., Кинзирский А.С. В сб: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Ер., 1998, с. 409–411.
11. Захарова Н.Б., Рубин В.И. – Лаб. дело, 1980, т. 12, с. 735–739.
12. Куделин Б.К., Каминский Ю.Л. и др. – Биохимия, 1979, т. 14, вып. 2, с. 368–371.
13. Светашев В.И. Микротехника анализа липидов и ее использование: Автореф. дис. На соискание уч. ст. канд. хим. наук. Владивосток, 1973, 25 с.
14. Дворецкий А.И., Айрапетян С.Н., Шаннская А.М., Чеботарев Е.Е. Трансмембранный перенос ионов при действии ионизирующей радиации на организм. Киев: Наукова думка, 1990, 135 с.

Ա. Հ. ԱՍՈՅԱՆ, Պ. Ա. ԴԱԶԱՐՅԱՆ, Ա. Ռ. ԵԴԻԱԶԱՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՊԵՊԱՆՅԱՆ

ԷՆԵՐԳԵՏԻԿ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՐՅԱՆ ԷՐԻԹՐՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ
ԻՈՆԱՅՆՈՂ ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՀԱՐՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ ԵՎ 4-ԲՈՒՆՈԼԻԴՆՈՒԴ
ՎԱՍ-167-Ի ՕԳՏԱԳՈՐԾՈՒՄԻՑ ՀԵՏՈ

Ամփոփում

Հաստատվել է, որ իոնացնող ճառագայթահարման ազդեցությունը արյան էրիթրոցիտներում բնութագրվում է վիճակագրորեն հավաստի ԱԵՖ-ի կոնցենտրացիայի իջեցմամբ և ԱՄՖ-ի կտրուկ բարձրացմամբ, որն ուղեկցվում է ԱԵՖ/ԱԿՖ, ԱԵՖ/ԱՄՖ հարաբերությունների և էներգետիկ լիցքի զգալի փոփոխություններով: 4-Բութանոլիդ ՎԱՍ-167-ի օգտագործումից հետո նկատվում է ուսումնասիրվող ցուցանիշների կարգավորման արտահայտված միտում, որը վկայում է տվյալ միացության որոշակի կենսաբանական ակտիվություն մասին:

A. H. ASOYAN, P. A. GHAZARYAN, A. R. EGHIAZARYAN, A. A. PEPANYAN

ENERGY METABOLISM IN BLOOD ERYTHROCYTE AT IONIZING
IRRADIATION AND AFTER USING OF 4-BUTANOLIDES VAS-167

Summary

It has been established that ionizing irradiation is characterized by a statistically reliable decrease in ATP concentration and sharp increase in AMP level in blood erythrocytes, accompanied by a significant alteration of ATP/ADP, ATP/AMP coefficient ratios and energetic charge. After application of 4-butanolides VAS-167 an expressed tendency to normalization of all studied indices is observed which testifies to a definite biological activity of the mentioned compound.