

ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК БССР

ТОМ XXXI



11

1987

УДК 546.21:541.515:547.857.7

В. Н. НИКАНДРОВ, Н. С. ПЫЖОВА, Ю. Е. КЛИНГЕР

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НУКЛЕОТИДОВ
С СУПЕРОКСИДНЫМИ РАДИКАЛАМИ
В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ***(Представлено академиком АН БССР Ю. М. Островским)*

При ряде патологических процессов в клетках и тканях отмечено усиленное образование радикалов кислорода, в том числе супероксидных ($O_2^{\cdot-}$) [1, 2]. Супероксидные радикалы повреждают АТФазную систему: АТФазная активность падает из-за снижения сродства энзима к АТФ и уменьшения скорости гидролиза [3].

Мы предположили возможность прямого воздействия $O_2^{\cdot-}$ на АТФ и ГТФ. Настоящая статья посвящена проверке этого предположения.

В эксперименте использованы 3 различные системы генерации $O_2^{\cdot-}$ -радикалов [4, 5]: I — никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН) — феназинметосульфат (ФМС), II — L-метионин — рибофлавин или III — аскорбат — ФМС — при комнатной температуре. Конечная концентрация ингредиентов в системах: I — НАДН — 234 мкМ, ФМС — 8 мкМ; II — L-метионин — 13 мМ, рибофлавин — 650 мкМ, тритон X-100 — 0,23%; III — аскорбиновая кислота — 750 мкМ, ФМС — 8 мкМ. Системы включали нитросиний тетразолий (НСТ) в конечной концентрации 87 мкМ и 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4 при общем объеме 4 мл. Образование $O_2^{\cdot-}$ в опытах учитывали в течение 2 мин по абсорбции формазана при 560 нм, запуская реакцию соответственно ФМС или рибофлавином. Исследуемые соединения добавляли до внесения этих реагентов.

Содержание железа в нуклеотидах определяли по реакции с *o*-фенантролином [6], образование неорганического орто- или пирофосфата — по реакции с молибденовым реактивом [7].

Все исследования выполнены не менее чем четырехкратно, результаты обработаны статистически с расчетом *t*-критерия Стьюдента [8]. Были использованы АДФ- Na_3 (Fluka), ФМС и тритон X-100 (Ferah) D-рибоза (Loba-Chemie), НАДН, рибофлавин, L-метионин, НСТ, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), АТФ- Na_2 , ГТФ- Na_3 , УТФ- Na , ЦТФ- Na , 5-АМФ- Na_2 , 3,5-АМФ- Na , рибозо-5-фосфат (Reanal). Остальные реактивы были отечественного производства, их подвергали соответствующей дополнительной очистке.

Добавка различных нуклеотидов в конечной концентрации 10^{-3} М вызвала в различной степени подавление восстановления НСТ, эффект зависел от системы генерации $O_2^{\cdot-}$ (табл. 1). В целом наиболее сильно действовали АТФ и ГТФ. Концентрационная зависимость эффекта нуклеотидов в системе НАДН—ФМС также свидетельствует о более сильном действии АТФ и ГТФ (рис. 1). В системе метионин—рибофлавин влияние АТФ сглаживалось, по-видимому, по следующим причинам.

Таблица 1. Влияние нуклеотидов в конечной концентрации 10^{-3} М на восстановление нитросинего тетразолия супероксидными радикалами в 0,06 М фосфатном буфере рН 7,4 ($n = 4$)

Нуклеотиды	Скорость реакции, $A_{560} \cdot \text{мин}^{-1}$ в системах генерации $O_2^{\cdot-}$		
	НАДН—ФМС	Аскорбат — ФМС	Метионин — рибофлавин
Контроль	$0,35 \pm 0,02$ (100)	$0,52 \pm 0,02$ (100)	$0,90 \pm 0,14$ (100)
АТФ	$0,09 \pm 0,02^*$ (27)	$0,24 \pm 0,01^*$ (46)	$0,69 \pm 0,11$ (77)
АДФ	$0,29 \pm 0,03$ (81)	$0,40 \pm 0,03^*$ (77)	$0,77 \pm 0,04$ (86)
5-АМФ	$0,30 \pm 0,01$ (85)	$0,44 \pm 0,04$ (85)	$0,71 \pm 0,07$ (79)
3,5-АМФ	$0,30 \pm 0,06$ (85)	не исслед.	$0,65 \pm 0,05$ (72)
ГТФ	$0,16 \pm 0,03^*$ (47)	$0,20 \pm 0,02^*$ (39)	$0,36 \pm 0,04^*$ (40)
УТФ	$0,32 \pm 0,04$ (90)	не исслед.	$0,73 \pm 0,11$ (81)
ЦТФ	$0,31 \pm 0,04$ (87)	не исслед.	$0,70 \pm 0,07$ (78)

* Изменения, статистически достоверные по отношению к контролю ($P < 0,05$); в скобках указаны изменения в % по отношению к контролю (см. и в табл. 2).

Так, генерация $O_2^{\cdot-}$ в этой системе требует ультрафиолетового облучения [4], вызывающего фотохимические процессы в молекулах нуклеотидов [9]. Кроме того, система содержит тритон X-100, в присутствии которого удлиняется время жизни $O_2^{\cdot-}$ [10]. Однако структура детергента предполагает возможность взаимодействия его с радикалами за счет бензольного кольца, гидроксильной, метильных и других групп. Введение тритона X-100 в систему НАДН—ФМС (из-за усиления восстановления НСТ концентрацию НАДН снизили в 3 раза) снижало эффект АТФ и ГТФ (рис. 1). Следовательно, на восстановление НСТ супероксидом заметно влияли лишь трифосфаты пуриновых нуклеотидов, причем эффект зависел от состава системы.

Сопоставление данных табл. 1 с действием (в конечной концентрации 10^{-3} М) на восстановление НСТ в системе НАДН—ФМС пиродифосфата ($A_{560} = 0,62 \pm 0,06$), D-рибозы ($0,39 \pm 0,03$), рибозо-5-фосфата ($0,55 \pm 0,04$) или гуанин-HCl ($0,34 \pm 0,04$) позволяет думать, что эффект АТФ и ГТФ

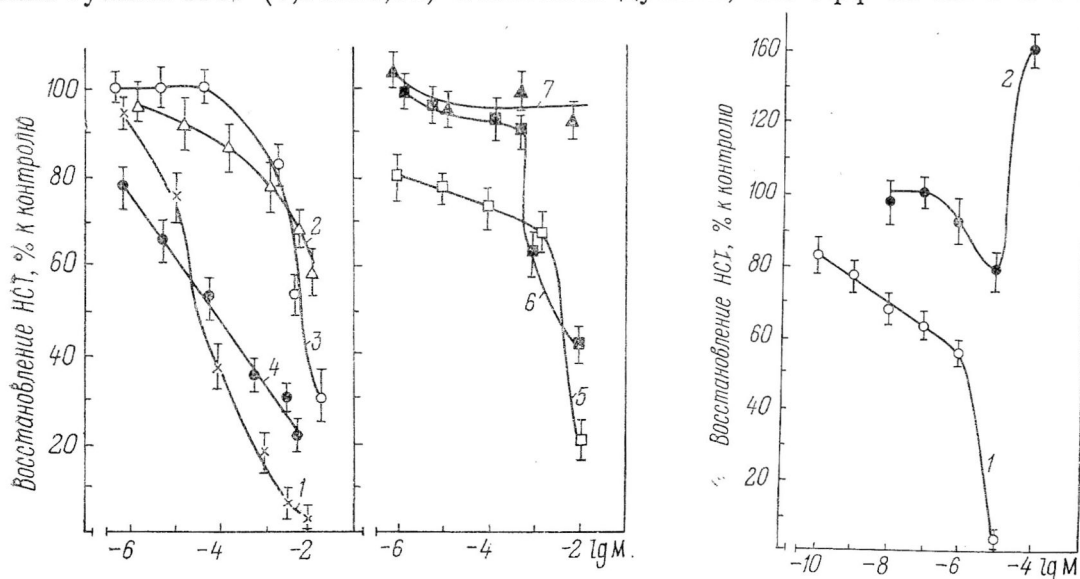


Рис. 1. Влияние АТФ (1), АДФ (2), 5-АМФ (3), ГТФ (4), 3,5-АМФ (5) на восстановление нитросинего тетразолия супероксидными радикалами в системе НАДН—ФМС и изменения эффекта АТФ (6) и ГТФ (7) на этот процесс в присутствии тритона X-100 в конечной концентрации 0,23%. Изменения даны в % к контролю, принятому за 100%

Рис. 2. Изменения восстановления нитросинего тетразолия (в % к контролю, принятому за 100%) супероксидными радикалами в системе НАДН—ФМС при внесении Cu^{2+} (1) или Fe^{3+} (2)

Таблица 2. Изменения восстановления нитросинего тетразолия супероксидными радикалами в системе НАДН—ФМС под действием различных соединений ($n = 4$)

Соединение	Скорость реакции, $A_{560} \cdot \text{мин}^{-1}$	Соединение	Скорость реакции, $A_{560} \cdot \text{мин}^{-1}$
Без добавок	$0,40 \pm 0,03$	КСНС, 10^{-3} М	$0,84 \pm 0,05$
АТФ, 10^{-3} М	$0,11 \pm 0,04^*$	ДЭДТК, 10^{-3} М	$0,90 \pm 0,05$
АДФ, 10^{-3} М	$0,33 \pm 0,03$	КСНС, 10^{-3} М +	
Fe^{3+} , 10^{-5} М	$0,31 \pm 0,01^*$	+ Fe^{3+} , 10^{-5} М	$0,74 \pm 0,06$
АДФ, 10^{-3} М + Fe^{3+} , 10^{-5} М	$0,23 \pm 0,02^*$	ДЭДТК, 10^{-3} М +	
Fe^{2+} , 10^{-5} М	$0,40 \pm 0,01$	+ Cu^{2+} , 10^{-6} М	$0,87 \pm 0,07$
АДФ, 10^{-3} М + Fe^{2+} , 10^{-5} М	$0,33 \pm 0,03$	о-Фенантролин, 10^{-3} М + АТФ, 10^{-3} М	$0,24 \pm 0,02$
о-Фенантролин, 10^{-3} М	$0,35 \pm 0,02$	КСНС, 10^{-3} М +	
		+ АТФ, 10^{-3} М	$0,34 \pm 0,04$
		ДЭДТК, 10^{-3} М +	
		+ АТФ, 10^{-3} М	$0,55 \pm 0,05$

не связан с наличием остатка пирофосфата, эфирной связи рибозофосфата или азотистого основания. Известна стимуляция перекисного окисления липидов нуклеотидами из-за наличия примесей железа [11, 12], причем эффективны все нуклеотиды с пирофосфатной группировкой. В нашем случае УТФ, ЦТФ и АДФ эффекта почти не давали. Химическим анализом мы нашли, что концентрация железа (10^{-3} атом/1 М нуклеотида) равна в АТФ $1,10 \pm 0,14$; АДФ $0,46 \pm 0,06$; в 5-АМФ $0,13 \pm 0,01$; 3,5-АМФ $1,90 \pm 0,25$; ГТФ $6,30 \pm 0,04$; в УТФ $8,10 \pm 0,10$. Таким образом, не прослеживается зависимость эффекта нуклеотидов от содержания в них железа. Даже добавками к АДФ Fe^{3+} или Fe^{2+} в концентрации на порядок выше, чем в АТФ, не достигнут эффект АТФ, $P < 0,05$ (табл. 2).

Отсутствие связи эффекта АТФ с наличием железа показано и с помощью комплексообразующих соединений. Установлено, что КСНС и диэтилдитиокарбамат (ДЭДТК) сами вдвое усиливали ($P < 0,001$) восстановление НСТ (табл. 2). Это не может быть следствием связывания примесей тех ионов, которые способны взаимодействовать с O_2^- , ибо Fe^{3+} и Fe^{2+} малоэффективны, а Cu^{2+} активен лишь при достаточно высокой концентрации (табл. 2, рис. 2). К тому же добавки к КСНС Fe^{3+} или к ДЭДТК Cu^{2+} снизили действие КСНС и ДЭДТК не более, чем на 14%. Очевидно, сами КСНС и ДЭДТК могут усиливать восстановление НСТ. Природа этого неясна, требует специального рассмотрения и выходит за рамки данной статьи. Ингибиторное действие АТФ проявлялось на фоне всех использованных комплексообразователей, $P < 0,02$ (табл. 2), хотя несколько слабее, чем в их отсутствие. В системе аскорбат—ФМС действие АТФ также было менее сильным, чем в системе НАДН—ФМС, а известно, что аскорбат восстанавливает Cu^{2+} и Fe^{3+} [13]. Изложенные материалы дают основания считать, что основное действие АТФ не связано с присутствием железа и является специфичным. В пользу этого свидетельствует и то, что включение Fe^{3+} в комплекс с АТФ или АДФ не повышает способность взаимодействия металла с O_2^- [14]. Как следует из вышеизложенного, при концентрации АТФ 10^{-2} М концентрация железа составит 10^{-5} М. В этом диапазоне ион малоэффективен (рис. 2).

При инкубации с системой НАДН—ФМС в дистиллированной воде (рН доведен до 7,2) АТФ или ГТФ в конечной концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М обнаружено образование неорганического ортофосфата в расчете на 1 М нуклеотида для АТФ — 0,07 М, а для ГТФ — 0,23 М.

Полученные результаты дают основания полагать, что в системах генерации O_2^- АТФ и ГТФ способны взаимодействовать с радикалами

кислорода. Нуклеотиды являются слабыми «тушителями» $O_2^{\cdot-}$, значительно уступая даже ионам металлов, однако эффект их, по-видимому, специфичен и, возможно, зависит от тех конформационных особенностей АТФ и ГТФ, которые обуславливают отличия их структурной организации в сравнении как с трифосфатами пиримидиновых нуклеотидов, так и с АДФ, АМФ. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. Зависимость подавления нуклеотидами восстановления НСТ от состава системы генерации $O_2^{\cdot-}$ может означать, что в конкретных биологических средах эффект АТФ будет проявляться по-разному. Обнаруженные факты можно рассматривать как проявление еще одного аспекта отношений АТФ, ГТФ и окисления: $O_2^{\cdot-}$ (или кислород)-зависимую модификацию АТФ и ГТФ.

Summary

In the systems of $O_2^{\cdot-}$ generation (methionine-riboflavin, NADH-phenazine methosulfate, ascorbate-phenazine methosulfate) the reduction of nirtobule tetrazolium is inhibited by ATP or GTP at the final concentration of 10^{-3} M (but not by UTP, CTP, ADP, AMP, inorganic pyrophosphate, riboso-5-phosphate). This effect was dependent on the composition of the generation systems but independent of the presence of iron in the nucleotides. It is suggested that ATP and GTP modifications may be $O_2^{\cdot-}$ (or oxygen)-dependent which is determined by the conformation of nucleotide molecules.

Литература

1. Афанасьев И. Б. // Кислородные радикалы в химии и биологии. Минск, 1984. С. 13—29.
2. Halliwell B., Gutteridge J. Mc. // Biochem. J. 1984. Vol. 219, N 1. P. 1—14.
3. Ventura C., Guarnieri C., Caldarega C. M. // Ital. J. Biochem. 1985. Vol. 34, N 4. P. 267—274.
4. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И., Клингер Ю. Е. // ДАН БССР. 1986. Т. 30, № 11. С. 1033—1036.
5. Garcia-Sancho J., Sanchez A., Handlogten M. E., Christensen H. N. // Proc. Natl. Acad. USA. 1977. Vol. 74. P. 1488—1491.
6. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965. 543 с.
7. Putnins R. F., Yamada E. W. // Anal. Biochem. 1975. Vol. 68, N 1. P. 185—195.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973. 320 с.
9. Конев С. В., Волотовский И. Д. Фотобиология. Изд. 2-е. Минск, 1979. 383 с.
10. Лапина В. А., Донцов А. Е., Островский М. А. // Биохимия. 1984. Т. 49, № 10. С. 1712—1718.
11. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972. 252 с.
12. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., 1975. 326 с.
13. Шейнберг И. Г., Морелл А. Дж. // Неорганическая биохимия. Т. 1. М., 1978. С. 361—376.
14. Flitter W., Kowley D. A., Halliwell B. // FEBS Letters. 1983. Vol. 158, N 2. P. 310—312.

Белорусский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
Минздрава БССР

Поступило 29.01.87