

И. В. ФИЛИПОВИЧ, З. И. ЖУЛАНОВА, З. А. ТРЕБЕНОК,  
Т. Н. ШЕРЕМЕТЬЕВСКАЯ, Е. Ф. РОМАНЦЕВ

**СВЯЗЫВАНИЕ  $\beta$ -МЕРКАПТОЭТИЛАМИНА  $S^{35}$  (МЭА- $S^{35}$ )  
С БЕЛКАМИ ЦИТОПЛАЗМЫ И ЯДЕРНОГО СОКА КЛЕТОК ТИМУСА  
КРЫС *IN VIVO***

(Представлено академиком С. Е. Севериным 11 II 1970)

Изучение механизма действия радиозащитных средств продолжает оставаться одной из центральных задач теоретической радиобиологии и радиационной биохимии. Практическая значимость изучения химической защиты от ионизирующей радиации очевидна, так как при этом открывается перспектива защиты млекопитающих и человека от поражающего действия радиации при различных ситуациях.

Ранее нами было показано, что максимальное накопление одного из наиболее эффективных радиозащитных средств — свободного МЭА после его внутрибрюшинного введения отмечалось в цитоплазме и ядрах клеток тимуса через 15—30 мин., т. е. совпадало во времени с максимальной радиозащитной эффективностью этого протектора (<sup>1</sup>). В то же время наиболее выраженное ингибирование радиочувствительных ферментных систем синтеза ДНК и РНК, а также образование АТФ в ядрах клеток тимуса, наступающее после введения МЭА животным, совпадало во времени с максимумом накопления свободного МЭА в тех же органеллах тимоцитов (<sup>2-5</sup>). Это позволило нам предположить, что по крайней мере одной из сторон радиозащитного действия МЭА является временное ингибирование им некоторых ферментативных реакций, протекающих в клетках радиочувствительных органов. Однако механизм этого ингибирования остается невыясненным. Хотя содержание МЭА в тимусе хорошо коррелирует во времени с вызываемыми этим протектором биохимическими изменениями и его радиозащитным действием, кажется маловероятным, чтобы ингибирующее действие оказывал именно свободной МЭА.

Известно, что *in vitro* аминотиолы стимулируют активность некоторых ферментных систем, и в частности — ответственных за синтез нуклеиновых кислот (<sup>2, 6-8</sup>). В то же время, установлено, что при введении в организм животных часть аминотиолов обнаруживается в связанной с белком форме (<sup>9</sup>). При этом некоторая доля радиопротектора связывается с белками смешанно-дисульфидной связью (<sup>9-11</sup>), причем *in vitro* образование смешанных дисульфидов МЭА с белками-ферментами подавляет каталитические свойства последних (<sup>12, 13</sup>). В представленной работе предпринята попытка обнаружить связывание МЭА с белками цитоплазмы и ядерного сока клеток тимуса крыс на разных сроках после внутрибрюшинного введения животным МЭА- $S^{35}$  в радиозащитной дозе.

Эксперименты проводили на беспородных белых крысах — самцах весом 130—150 г. МЭА- $S^{35}$ -HCl вводили внутрибрюшинно в радиозащитной дозе (150 мг/кг в расчете на основание;  $2,4 \cdot 10^8$  имп. за 100 сек. на крысу). Через различные промежутки времени (2; 15; 30; 60; 120 мин.) животных декапшировали, тимус несколько раз тщательно промывали в среде, используемой для выделения ядер. Ядра выделяли по модифицированному

методу Клауена и Бетел<sup>(5)</sup>. Надосадочную фракцию, полученную после выделения ядер, центрифугировали при 150 000 *g* в течение часа. Белки ядерного сока экстрагировали из ядер 0,14 *M* раствором NaCl. Из полученных надосадочных фракций белки осаждали добавлением сульфата аммония. Белковые осадки несколько раз промывали насыщенным раствором сульфата аммония до отсутствия радиоактивности в промывных водах, а затем растворяли в 1,6 мл трис-HCl-буфера pH 9,0. Часть раствора наносили на мишень для подсчета радиоактивности в установке «Волна» с торцовым счетчиком Т-25-БФЛ. К оставшейся части раствора добавляли 1 *M* раствор дитиозеритрита (ДТТ, реактив Кэландра), и через 15 мин. белки осаждали хлорной кислотой. ДТТ специфически расщепляет смешанно-дисульфидные связи МЭА с белком, и таким образом радиоактивность надосадочной жидкости после осаждения белков принадлежит МЭА-S<sup>35</sup>, ранее связанному с белком смешанно-дисульфидной связью. В контрольных экспериментах нами было установлено, что хлорная кислота в данных условиях не высвобождает связанной с белком радиоактивности. Степень связывания МЭА с белками связями, отличными от смешанно-дисульфидных, определяли по разности между радиоактивностью белков до обработки ДТТ и после расщепления смешанно-дисульфидных связей. Результаты выражали в импульсах за 1000 сек. на 10 мг белка. Белок определяли по биуретовому методу в микромодификации Итцаки<sup>(14)</sup>. Каждый



Рис. 1. Динамика накопления различных связанных форм МЭА-S<sup>35</sup> с белками ядерного сока и гиалоплазмы тимуса. Накопление МЭА-S<sup>35</sup>, связанного с белками гиалоплазмы (1) и ядерного сока (2) связями, отличными от смешанно-дисульфидных (вычислено по разности). 3 и 4 — накопление МЭА-S<sup>35</sup>, связанного с белками гиалоплазмы и ядерного сока смешанно-дисульфидными связями

эксперимент повторяли не менее двух раз.

Полученные результаты представлены в табл. 1 и на рис. 1. Как следует из табл. 1, МЭА быстро проникает в ткань тимуса. Уже через 2 мин. после введения МЭА-S<sup>35</sup> радиоактивность обнаруживается как в цитоплазме тимуса, так и в ядрах клеток этого органа. К этому же времени в гиалоплазме обнаруживается связанный МЭА. Максимальное накопление радиоактивной метки в ядрах отмечается через 15—30 мин. после введения протектора. Эти данные хорошо совпадают с полученными нами ранее при использовании фторпириватного метода<sup>(1)</sup>. Однако радиоактивность гиалоплазмы со временем монотонно увеличивается. Очевидно, это связано с тем, что при определении радиоактивности в данном случае учитывается не только свободный МЭА, но и его метаболиты различных степеней окисления, в то время как фторпириватный метод дает возможность специфически обнаружить только МЭА. Максимальное количество метки обнаруживается в гиалоплазме, а на долю МЭА, связанного с различными белками, приходится сравнительно небольшая часть радиоактивности. Это хорошо совпадает с данными Мондови и сотрудников, изучавших распределение S<sup>35</sup>-цистамина в тимусе через 15 мин. после его введения крысам<sup>(15)</sup>. Следует подчеркнуть, что связывание МЭА с белками гиалоплазмы тимуса отмечается нами уже через 2 мин. после его введения, так же как это показано в экспериментах Бетца и сотрудников с цистамином<sup>(16)</sup>. Формы связи протектора с белками этими авторами не определялись. В наших экспериментах удалось показать, что содержание МЭА-S<sup>35</sup>, связанного с белками гиалоплазмы и ядерного сока клеток тимуса связями, отличными от смешанно-дисульфидных, возрастает с увеличением времени

Таблица 1

Распределение радиоактивной метки между различными клеточными фракциями тимуса на разных сроках после введения животным МЭА-S<sup>35</sup> (имп. за 1000 сек. на 10 мг белка)

| Фракция                                                                                         | Радиоактивность через различные промежутки времени после введения МЭА-S <sup>35</sup> |             |             |             |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                                                                                 | 2 мин.                                                                                | 15 мин.     | 30 мин.     | 60 мин.     | 120 мин.    |
| Гомогенат ткани                                                                                 | 4335±855                                                                              | 22 830±2200 | 22 650±2250 | 24 670±1580 | 1390±3020   |
| Суспензия ядер                                                                                  | 1250±307                                                                              | 7790±150    | 10 370±1150 | 8880±270    | —           |
| Надосадочная, полученная после удаления ядер (по разности)                                      | 2610±1015                                                                             | 13 750±1400 | 12 275±1095 | 15 890±1880 | 2314±240    |
| Надосадочная, полученная после центрифугирования гомогената при 105 000 g (гиалоплазма)         | 5250±1020                                                                             | 20 120±3820 | 25 210±4790 | 31 360±8110 | 31 710±4530 |
| МЭА-S <sup>35</sup> , связанный с белками гиалоплазмы                                           | 70±30                                                                                 | 290±70      | 370±12      | 290±25      | 220±15      |
| МЭА-S <sup>35</sup> , связанный с белками ядерного сока                                         | —                                                                                     | 175±90      | 277±87      | 260±30      | 380±50      |
| МЭА-S <sup>35</sup> , связанный с белками ядерных мембран и хромосомного аппарата (по разности) | —                                                                                     | 7020±60     | 10 070±1300 | 8650±300    | —           |

от введения препарата (рис. 1, 1, 2). Вместе с тем количество МЭА-S<sup>35</sup>, связанного с этими же белками смешанно-дисульфидными связями, резко увеличивается в период 15—30 мин. после введения аминотиола, а затем снижается (рис. 1, 3, 4).

Таким образом, максимальная величина связывания протектора с белками зубной железы смешанно-дисульфидными связями отмечается именно на тех сроках, когда МЭА обладает выраженной защитной эффективностью. Характерно, что именно на тех же сроках после введения МЭА наблюдалось максимальное ингибирование систем образования предшественников ДНК (тимидинкиназы и системы переноса дезоксирибозы) (2, 3) и включения 2-C<sup>14</sup>-урацила в РНК изолированных ядер тимуса (6).

По нашим данным, ресинтез АТФ в изолированных ядрах тимуса резко ингибируется через 10 мин. после введения крысам МЭА (6). Хотя системы, ответственные за аэробную генерацию АТФ, локализованы главным образом в ядерных мембранах, а определение смешанных дисульфидов МЭА с мембранными белками нами не проводилось из-за методических трудностей, можно предположить, что и в данном случае максимальная величина связывания протектора смешанно-дисульфидной связью приходится на те же сроки, что и для остальных исследованных фракций (белков ядерного сока и белков гиалоплазмы) (рис. 1, 3, 4). Во фракции белков ядерного сока (ядерных глобулинов) частично локализованы ферменты гликолиза. Поэтому ингибирование гликолиза, наступающее, например, после добавления МЭА к культуре клеток, также может объясняться образованием смешанных дисульфидов протектора с этими ферментами (13).

Таким образом, логично допустить, что временное ингибирование радиочувствительных биохимических реакций, наблюдающееся после введения МЭА и совпадающее с максимумом его радиозащитного действия, может объясняться образованием смешанных дисульфидов между протектором и ферментами, ответственными за протекание этих реакций. Распад смешанно-дисульфидных связей, происходящий с течением времени, приводит к реактивации ферментных систем и к возобновлению их каталитического действия.

# ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> I. V. Filippovich, N. N. Koshcheenko, E. F. Romantzev, *Biochem. Pharm.*, 19 (1970), in press.
- <sup>2</sup> И. В. Филиппович, Е. Ф. Романцев, *Радиобиология*, 8, 800 (1968).
- <sup>3</sup> Т. Н. Шереметьевская, И. В. Филиппович, Е. Ф. Романцев, *Вопр. мед. химии*, 16, 437 (1970).
- <sup>4</sup> E. F. Romantzev, N. N. Koshcheenko, I. V. Filippovich, *Progress Biochem. Pharm.*, 2 (1969).
- <sup>5</sup> З. И. Жуланова, Е. Е. Колесников, Е. Ф. Романцев, *Вопр. мед. химии*, 15, 396 (1969).
- <sup>6</sup> Н. Н. Кошеченко, Е. Ф. Романцев, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 4, 567 (1968).
- <sup>7</sup> T. Sanner, A. Pihl, *J. Biol. Chem.*, 238, 165 (1963).
- <sup>8</sup> H. J. Grav, R. M. S. Smellie, *Biochem. J.*, 94, 518 (1965).
- <sup>9</sup> L. Eldjarn, A. Pihl, *J. Biol. Chem.*, 223, 341 (1956).
- <sup>10</sup> K. Lauber, H. Aebi, A. Zuppinger, *Biochem. Zs.*, 332, 434 (1960).
- <sup>11</sup> И. В. Филиппович, Н. Н. Кошеченко, Е. Ф. Романцев, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 4, 626 (1968).
- <sup>12</sup> P. Lelievre, *C. R. Soc. Biol.*, 153, 1879 (1959).
- <sup>13</sup> P. Lelievre, *C. R. Soc. Biol.*, 154, 466 (1960).
- <sup>14</sup> R. F. Itzhaki, D. M. Gill, *Anal. Biochem.*, 9, 401 (1964).
- <sup>15</sup> B. Mondovi, L. Tentori et al., *Int. J. Rad. Biol.*, 4, 371 (1962).
- <sup>16</sup> E. H. Betz, D. J. Mewissen, P. L. Lelievre, *Int. J. Rad. Biol.*, 4, 231 (1962).