

УДК 577.391.546.11

БИОХИМИЯ

Т. Е. ПАВЛОВСКАЯ, Л. И. ХАРЧЕНКО

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА БЕЛКАМИ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 23 XI 1970)

Определение количества кислорода, связываемого белковыми молекулами во время облучения ионизирующим излучением, имеет важное значение для выяснения механизма кислородного эффекта. Однако этот вопрос до сих пор остается неизученным, и в литературе отсутствуют прямые данные по этому поводу. Косвенная оценка связывания кислорода белком была получена при изучении взаимоотношений кислорода и красителя маляхитового зеленого с сывороточным альбумином человека при облучении водных растворов белка рентгеновскими лучами в дозах до 300 кр. В изученных условиях величина связывания кислорода составила 1—2 молекулы O_2 на одну молекулу белка (¹). При изучении механизма рекомбинации радикалов белка (облученного γ -лучами Co^{60} в дозах 20—50 Мрад) в присутствии кислорода была получена количественная оценка связывания уже облученным белком, составившая 2,9—3,5 молекул O_2 на один радикал белка (²). Настоящая работа посвящена прямому определению количества кислорода, связываемого белком в процессе облучения, с применением стабильного изотопа O^{18} .

В качестве объекта исследования брался сывороточный альбумин человека в виде 10% водного раствора и сухого препарата. Облучение γ -лучами Co^{60} проводилось на гамма-установке ГУРХ-40 000 при мощности излучения 100, 200 и 370 р/сек. Образцы белка облучались в присутствии чистого кислорода, обогащенного изотопом O^{18} на 41%, полученного электролизом тяжелой кислородной воды (³) и очищенного от возможной примеси озона. Насыщение кислородом тщательно откачанных образцов белка (растворы брались в объеме 0,5 мл) производилось в течение 20—24 час. при 4° в колбах, имеющих объем ~70 мл. После облучения водные растворы белка лиофилизировались. Контролем на связывание кислорода необлученным белком служили образцы белка, выдержанные в атмосфере кислорода, обогащенного O^{18} , в тех же условиях, что и опытные образцы, в течение времени, соответствующего времени облучения максимальной дозой. Определение связанного белком при облучении кислорода, обогащенного O^{18} , производилось по методу, описанному для аминокислот и пептидов (⁴). Применительно к белкам были подобраны условия, при которых сухие образцы белка (25 мг) сжигались при 530° в течение 3 час. в откачанных и запаянных ампулах в присутствии сулемы (250 мг). Навеска белка бралась из расчета, что при полном окислении белка будет образовываться не менее 0,1 ммоль CO_2 . CO_2 , обогащенный O^{18} , очищали от возможных примесей газов выдерживанием над хинолином и многократным перемораживанием в градиенте низких температур и откачиванием неконденсирующихся газов. Концентрация O^{18} в образцах CO_2 определялась на масс-спектрометре МИ-1305 с точностью $\pm 2\%$. При оценке количества связанного при облучении кислорода (в атомах на молекулу белка) учитывалось, что молекула сывороточного альбумина (молекулярный вес 69 000) содержит 940 атомов O (⁵).

Анализ препаратов CO_2 показал, что содержание в них изотопа O^{18} изменяется в зависимости от дозы облучения для растворов белка в пределах от 0,225 до 0,343 ат. % и для сухих препаратов от 0,250 до 0,352 ат. %. Для контрольных, необлученных образцов белка эти значения составили 0,241 ат. %, что соответствует связыванию 0,17 атомов О на молекулу белка.

Кривые зависимости связывания кислорода растворенным белком от дозы облучения имеют своеобразный характер (рис. 1). Первоначально эта зависимость изображается выпуклой кривой, затем наблюдается пере-

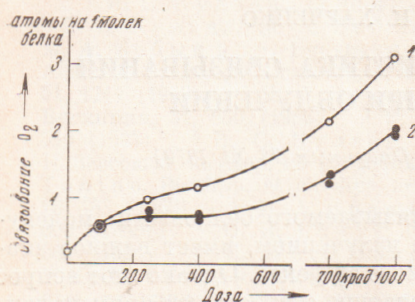


Рис. 1

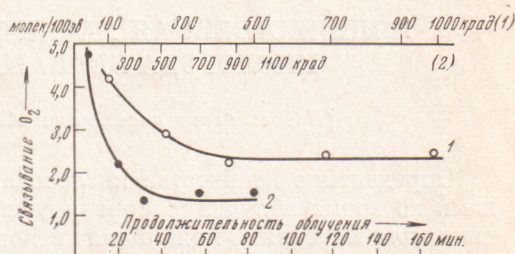


Рис. 2

Рис. 1. Связывание кислорода сывороточным альбумином человека в растворе (10%) при облучении гамма-лучами Co^{60} при мощности дозы 100 р/сек (1), при мощности дозы 200 р/сек (2)

Рис. 2. Выходы связывания кислорода сывороточным альбумином человека в растворе (10%) при облучении гамма-лучами Co^{60} при мощности дозы 100 р/сек (1) и 200 р/сек (2)

од, когда связывание кислорода белком мало зависит от дозы. При высоких дозах регистрируется рост связывания кислорода с дозой, причем по отчетливо выраженному линейному закону. В зависимости от использованной в опыте мощности дозы связывание кислорода изменяется по кривым 1 и 2. При низких дозах связывание кислорода белком мало зависит от мощности дозы и составляет при дозе 100 кр около 0,5 атома О на молекулу белка. Различие в связывании становится заметным с повышением дозы облучения, и при максимальной дозе 1000 кр на одну молекулу белка связывается 3,15 атома О, при мощности дозы 100 р/сек и 2,05 атома О — при мощности дозы 200 р/сек.

В силу своеобразного характера зависимости связывания кислорода растворенным белком при облучении представлялось целесообразным характеризовать радиационный выход связывания кислорода белком (число связанных молекул кислорода на 100 экв поглощенной энергии) не тем вычислением фактора G , когда фактически доза отсчитывается от нуля (т. е. когда G вычисляется как $G = \eta \left(\frac{dC}{dD} \right)_{D \rightarrow 0}$, а вычислить эту производную по ходу дозной зависимости. Поэтому в настоящей работе было вычислено значение $G_i = \eta \left(\frac{dC}{dD} \right)_{D \rightarrow D_i}$ по ходу вышеуказанной зависимости. При этом, естественно, была получена зависимость $G = f(D)$, которая представлена на рис. 2 в качестве функции продолжительности облучения.

Из хода кривых 1 и 2 четко вырисовывается зависимость выхода связывания кислорода белком в процессе облучения от распределения дозы во времени. Выходы связывания кислорода белком характеризуются более высокими значениями при использовании излучения с меньшей мощностью дозы, а следовательно при более длительных экспозициях (рис. 2, 1). Однако при низких дозах облучения выходы связывания кислорода белком для двух изученных мощностей доз имеют наиболее высокие и по значе-

нию близкие величины. Так, при дозе 100 кр и мощности дозы 100 р/сек $G = 4,20$, а при 200 р/сек $G = 4,70$. Характерным является сохранение постоянных выходов связывания O_2 для каждой из изученных мощностей доз при продолжительности облучения начиная приблизительно с 40–60 мин. При этом $G = 2,25$ (при 100 р/сек) и $G = 1,6$ (при 200 р/сек).

Наблюдаемая зависимость выхода радиационно индуцированного связывания кислорода белком от распределения дозы во времени, а также наблюдаемое постоянство значений выхода начиная с определенных доз, по-видимому, можно объяснить тем, что лимитирующим фактором в этом процессе является растворение и диффузия кислорода в раствор в процессе облучения. Роль этого фактора незначительна при низких дозах облучения, когда экспозиция мала, а исходный раствор белка насыщен кислородом. В этих условиях при дозе 100 кр в обоих случаях связывается примерно половина растворенного O_2 . Почти весь растворенный кислород расходуется при увеличении экспозиции, соответствующей приблизительно дозе 400 кр. По-видимому, выше этой дозы скорость связывания кислорода белком должна уже определяться скоростью его поступления в раствор из газовой фазы. Предварительные подсчеты показали, что величины этих скоростей имеют близкие значения. Так, количество поступившего кислорода в 1 сек. из газовой фазы в раствор, рассчитанное по формуле диффузионного потока (^{9, 7}), с учетом растворения кислорода в белковом растворе (⁸), в условиях опыта составляет $1,5 \cdot 10^{14}$ атомов O в 1 сек, тогда как скорости связывания O_2 , рассчитанные из экспериментальных данных, составляют для мощности дозы 100 р/сек $1,4 \cdot 10^{14}$ атомов O в 1 сек, а для мощности дозы 200 р/сек $1,6 \cdot 10^{14}$ атомов O в 1 сек. Этим, по-видимому, и можно объяснить сохранение постоянства выхода связывания кислорода при дозах выше 400 кр.

Связывание кислорода сухим белком в процессе облучения также растет с увеличением дозы облучения и с уменьшением мощности дозы. Для мощности дозы 100 р/сек были получены следующие данные: при дозах 540, 1620 и 2520 кр число связанных атомов O в одной молекуле белка соответственно равно 1,07; 1,96; 3,28.

Следует отметить, что (для сравнимых доз) величины связывания кислорода сухим белком имеют меньшие значения, чем соответствующие величины связывания O_2 для растворенного белка.

Для мощности дозы 370 р/сек поглощение кислорода сухим белком характеризуется значениями: при дозах 1000, 3000 и 5000 кр число связанных атомов O на 1 молекулу белка соответственно 1,12, 2,63, 3,54.

Выходы радиационно индуцированного связывания кислорода сухим белком (рассчитанные аналогично выходу связывания O_2 для растворенного белка) также зависят от распределения дозы во времени и имеют наибольшие значения для меньшей мощности дозы. Так, для мощности дозы 100 р/сек и дозы 540 кр $G = 14,15$, а для дозы 2520 кр $G = 9,85$. Выходы связывания кислорода сухим белком при мощности дозы 370 р/сек следующие: при дозах 1000, 3000 и 5000 кр выход связывания кислорода G (в молекулах O_2 на 100 эв) соответственно 7,95, 6,25, 5,05.

Наблюдаемую зависимость связывания O_2 сухим белком от мощности дозы также, по-видимому, можно объяснить ограниченной диффузией O_2 в облучаемый объект. На роль этого фактора при облучении сухих препаратов белков указывалось в литературе (^{9, 10}). При расчете глубины проникновения O_2 в опытные твердые образцы белка, толщиной 1 мм, по формуле, указанной в (⁹), нами было получено, что при мощности дозы 370 р/сек глубина проникновения кислорода равна 0,48 мм, а для мощности дозы 100 р/сек — 0,64 мм. Эти данные хорошо согласуются с расчетом диффузии O_2 в сухой облучаемый препарат трипсина (⁹).

Таким образом, из полученных данных следует, что при действии ионизирующего излучения на водные растворы и сухие препараты белка проис-

ходит связывание относительно малого количества O_2 . Количество связанного кислорода в изученных условиях не превышало 3,5 атомов О на молекулу белка.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
19 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Е. Павловская, А. Г. Пасынский, ДАН, 149, 976 (1963). ² И. И. Сапежинский, Н. М. Эмануэль, ДАН, 165, 845 (1965). ³ С. М. Slack, L. F. Ehrke, Rev. Sci. Instruments, 8, 39 (1937). ⁴ D. Rittenberg, L. Pontecorve, Intern. J. Appl. Rad. Isot., 1, 208 (1956). ⁵ Ф. Гауровиц, Химия и функция белков, М., 1965. ⁶ Д. А. Франк-Каменецкий, Диффузия и теплопередача в химической кинетике, «Наука», 1967. ⁷ D. M. Himmelblau, Chem. Rev., 64, 527 (1964). ⁸ Р. И. Школьникова, Уч. зап. Ленингр. ун-в., сер. хим., № 18, 64 (1959). ⁹ F. Hutchinson, E. Watts, Radiation Res., 14, 803 (1961). ¹⁰ J. A. Butler, A. V. Robins, Radiation Res., 17, 631 (1962).