

УДК 577.15.046

БИОХИМИЯ

И. В. ФИЛИПОВИЧ, З. И. ЖУЛАНОВА, В. Б. КОЛИНА,
Л. П. МИХАЙЛОВА, Т. Н. ШЕРЕМЕТЬЕВСКАЯ, Е. Ф. РОМАНЦЕВ

РОЛЬ СМЕШАННО-ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В РАДИОЗАЩИТНОМ ДЕЙСТВИИ β -МЕРКАПТОЭТИЛАМИНА (МЭА)

(Представлено академиком С. Е. Севериным 29 VII 1971)

Работами последних лет показано, что радиопротекторы — аминоктиолы и в частности МЭА, при введении млекопитающим до облучения вызывают у них резкую перестройку метаболических систем, в конечном счете приводящую к увеличению общей радиоустойчивости организма (¹, ²). С биохимической точки зрения эта перестройка выражается, в частности, в значительном временном ингибировании ферментативных реакций синтеза нуклеиновых кислот, а также систем, ответственных за аккумуляцию энергии в клетке, причем максимальное ингибирование этих процессов совпадает с оптимальным временем проявления радиозащитного эффекта МЭА (10—30 мин. после введения протектора) (³, ⁴).

В ранее опубликованной нами работе было показано, что максимальное накопление смешанных дисульфидов МЭА с белками гиалоплазмы и ядерного сока клеток тимуса крыс наблюдается через 15—30 мин. после введения аминоктиола (⁵). В дальнейшем мы установили, что ингибирование одного из ферментов (дезоксирибозилтрансферазы), ответственного за синтез дезоксицитидиннуклеотидов в ткани тимуса крысы, по крайней мере частично связано с обратимым торможением его активности за счет временного образования смешанного дисульфида между ферментом и остатком молекулы МЭА (⁶).

В связи с этими данными возникает вопрос, являются ли смешанные дисульфиды МЭА с тканевыми белками единственными формами связанного протектора, коррелирующими во времени с его биохимическим и радиозащитным эффектом.

Целью настоящей работы явилось исследование всех возможных типов связей МЭА с белками гиалоплазмы тимуса, а также некоторых субклеточных структур селезенки и печени крыс на разных сроках после введения протектора животным. Полученные данные были сопоставлены с изменением количества смешанных дисульфидов в тех же объектах исследования во времени.

В экспериментах использовали беспородных белых крыс-самцов весом до 150 г. МЭА- C^{14} -битартрат (уд. радиоактивность 91,4 мС/г, 99,5% чистоты) вводили внутривентриально в дозе 150 мг/кг (в расчете на основание, $1 \cdot 10^7$ имп/100 сек на 1 крысу). Животных декапитировали через 2, 15, 30 и 90 мин. после введения радиопротектора. Тимус, селезенку и печень несколько раз тщательно промывали в средах, используемых для дальнейшей гомогенизации тканей. Тимус гомогенизировали в 0,25 М сахарозе, содержащей 0,003 М $CaCl_2$ и 0,005 М трис, pH 7,1. Гомогенат центрифугировали при 105 000 g в течение 1 часа. Ядра селезенки выделяли по методу Хогебума и Шнейдера (⁷). Для получения глобулиновой фракции ядра экстрагировали 0,14 М NaCl. Остаток после экстракции глобулинов, включающий в себя гистоны, кислые и остаточные белки, условно обозначали как «фракцию ДНП». Митохондрии печени получали по методу, описанному В. П. Скулачевым (⁸). Выделение тяжелой субмитохондриальной

фракции (ТСФ) проводили по методу Парсона (9). * Белки гиалоплазмы тимуса и глобулиновой фракции ядер селезенки осаждали 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Полученные белковые осадки отмывали 5% ТХУ до полного отсутствия радиоактивности в промывных водах. Суспензию ТСФ в 0,25 M сахарозе осаждали 10% ТХУ и полученный осадок также тщательно промывали 5% ТХУ. Осадки полученных белков обезжиривали последовательной обработкой ацетоном, спиртом и эфиром.

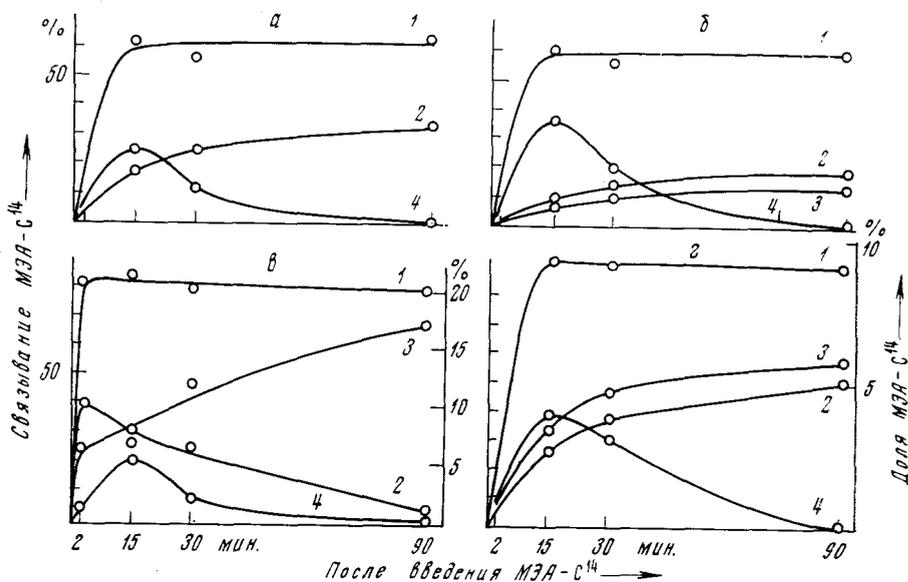


Рис. 1. Связывание МЭА-С¹⁴ с исследованными белками различными типами связей в зависимости от времени после введения препарата животным. Белки глобулиновой фракции (а), фракции ДНП ядер селезенки (б), ТСФ митохондрий печени (в), гиалоплазмы тимуса (г). Адсорбционная (1), тиоэфирная (2), амидная (3) и смешанно-дисульфидная (4) связь

Полученные образцы белков гиалоплазмы тимуса, ядерных глобулинов и фракции ДНП, а также ТСФ печени растворяли в 0,05 N растворе едкого натра. Если белок растворялся не полностью, то нерастворившуюся часть отделяли центрифугированием. После определения количества белка в надосадочной жидкости (10) и его удельной радиоактивности белковые растворы подвергали обработке по разработанной нами схеме, позволяющей последовательно отщеплять МЭА, связанный с белками различными типами связей.

Определение МЭА, связанного с белками тиоэфирными связями (за счет SH-групп аминокислот и белковых COOH-групп), проводили при обработке суспензии соответствующих белков 3 M раствором гидроксилamina (рН 7,4 (11)). Количество МЭА, связанного тиоэфирными связями, определяли по убыли радиоактивности после обработки белков гидроксиламином.

МЭА, связанный с исследованными белками смешанно-дисульфидными связями, определяли после обработки белков дитиоэритритом (после предварительного расщепления тиоэфирных связей) по ранее описанному нами методу (5). Количество МЭА, связанного с белками адсорбционными связями, определяли по разности в радиоактивности белков до и после исчерпывающего диализа против раствора немеченного МЭА, аналогично тому, как это предложено в методике для определения степени включения серусодержащих аминокислот в белки (12).

* «Чистая фракция внутренних мембран» по Парсону в данной работе названа тяжелой субмитохондриальной фракцией, поскольку оценку чистоты получаемых препаратов не проводили.

Так как отщепление МЭА, связанного с белками нековалентными связями, частично происходит также и при переосаждении белка из щелочных растворов (¹³, ¹⁴), то в тех случаях, когда такое переосаждение проводилось, учитывали убыль радиоактивности белков. В дальнейшем эту величину суммировали с разностью в радиоактивности белков до и после их дигализа против раствора немеченного МЭА.

Содержание МЭА, связанного с белками посредством амидных связей (за счет NH₂-группы аминокислоты и COOH-групп белка), определяли по остаточной радиоактивности белков после удаления протектора, связанного адсорбционными, тиоэфирными и смешанно-дисульфидными связями. Результаты выражали в процентах от начальной радиоактивности белка, полученной при измерении радиоактивности исходных растворов белков в 0,05 N растворе NaOH. Радиоактивность образцов определяли на установке «Волна» с торцовым счетчиком Т-25-БФЛ.

Связывание МЭА-S¹⁴ с исследованными белками различными типами связей в зависимости от времени после введения радиопротектора представлено на рис. 1. Как можно видеть, основная часть введенного МЭА присоединяется к белкам адсорбционными связями (рис. 1, 1). Это совпадает с данными Брэдфорда с сотрудниками, которые при введении мышам одного из радиозащитных меркаптоаминов (меркаптоэтилгуанидина-S³⁵) показали, что 50—75% от введенного соединения связывается с белками нековалентными связями (¹⁵). Аналогичным образом в экспериментах *in vitro*, проведенных с использованием другого протектора (β-меркаптопропиламина-S¹⁴) более 70% аминокислоты связывалось с ядерными белками клеток печени мышей адсорбционными связями (¹⁶).

В наших экспериментах быстрое присоединение МЭА к белкам происходило в течение первых десяти минут после введения препарата, и в дальнейшем количество адсорбированного аминокислоты оставалось примерно на одном уровне.

Количество МЭА, связанного с исследованными белками тимуса и селезенки тиоэфирной связью, с увеличением времени от введения препарата увеличивалось (рис. 1, 2, а, б, г). Содержание протектора, соединенного с белками ТСФ печени этой связью, через несколько минут после введения МЭА достигало максимального уровня и в дальнейшем снижалось (рис. 1, 2, в). Целесообразно отметить, что Коллман с сотрудниками, следуя связыванию гуанидоэтилдисульфида-S³⁵ с белками гомогенатов некоторых органов мышей через 20 мин. и 2 часа после введения соединения животным, обнаружили, что содержание протектора, связанного с белками селезенки и семенников тиоэфирными связями, со временем увеличивалось (¹⁷). Однако для белков тканей печени, тонкого кишечника и почек наблюдалась противоположная картина: через 2 часа после введения препарата количество протектора, связанного с белком тиоэфирными связями, снижалось.

Связывание МЭА с белками гялоплазмы тимуса, ДНП ядер селезенки и ТСФ печени амидными связями увеличивалось со временем (рис. 1, 3, б, в, г). В то же время во фракции глобулярных белков ядер селезенки (рис. 1, а) заметных количеств МЭА, связанного амидными связями, обнаружить не удалось. Следует отметить, что количество аминокислоты, связанного с фракцией ДНП ядер селезенки амидными связями, составляло лишь небольшую долю от всего количества связанного протектора. По данным Кальстратова и Романцева, содержание β-меркаптопропиламина-S¹⁴, связанного амидными связями с белками ядер печени мышей *in vitro*, составляло лишь около 9% от общего количества связанного аминокислоты (¹⁶).

Как видно из рис. 1, во всех исследованных нами объектах содержание смешанных дисульфидов МЭА с белками (рис. 1, 4, а, б, в, г) достигало максимального уровня спустя 15 мин. после введения радиопротектора, а в дальнейшем снижалось. Это совпадает с результатами, полученными нами ранее при исследовании связывания МЭА-S³⁵ с белками гялоплазмы и ядерного сока клеток тимуса крыс при введении препарата животным (⁵).

Таким образом, лишь максимальное содержание смешанных дисульфидов МЭА, образованных различными тканевыми белками, коррелирует во времени с максимумом проявления радиозащитного действия протектора и с вызываемыми им биохимическими изменениями. Эти совпадающие результаты, полученные нами на разнообразных белковых фракциях различных органов и микроструктур (белки ядер селезенки, ТСФ митохондрий печени и гиалоплазмы тимуса), говорят о том, что из всех многообразных форм связей радиозащитных аминотиолов с клеточными белками лишь связь по типу смешанного дисульфида играет ведущую роль в их биохимическом радиозащитном механизме, т. е. в создании в организме состояния повышенной радиорезистентности после введения радиопротекторов.

Остальные типы связей не коррелируют с максимальным радиозащитным эффектом МЭА и с глубиной проявления вызываемых МЭА биохимических изменений, что не позволяет приписать им ведущую роль в реализации биохимического радиозащитного механизма. Однако, поскольку механизм химической защиты млекопитающих является комплексным, то это не означает, что МЭА, связанный, например, с белками адсорбционными связями, не вносит определенного вклада в общий эффект радиозащиты. Нельзя исключить, что своеобразная «протекторная изоляция» предотвращает и прямое поражение белков радикалами-окислителями, возникающими при облучении.

Институт биофизики
Министерства здравоохранения СССР
Москва

Поступило
14 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. Ф. Романцев, Радиобиология, **7**, 689 (1967). ² Z. M. Bacq, R. Goutier, Brookhaven Sympos. Biol., **20**, 241 (1968). ³ I. V. Filippovich, N. N. Koshchenko, E. F. Romantzev, Biochem. Pharm., **19**, 2533 (1970). ⁴ З. И. Жуланова, Е. Е. Колесников, Е. Ф. Романцев, Вопр. Мед. хим., **15**, 396 (1969). ⁵ И. В. Филиппович и др., ДАН, **195**, 222 (1970). ⁶ I. V. Filippovich, T. N. Shemeteyevskaya, E. F. Romantzev, Biochem. Pharm., **20**, 135 (1971). ⁷ G. U. Hoogboom, W. C. Schneider, M. Schrieberich, J. Biol. Chem., **196**, 111 (1952). ⁸ В. П. Скулачев, В кн. Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», 1969, стр. 248. ⁹ D. F. Parsons, G. R. Williams, In: Methods in Enzymology, **10**, 1967, p. 443. ¹⁰ O. H. Lowry et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ¹¹ G. Kollmann, B. Shapiro, E. E. Schwartz, Cancer Res., **24**, 120 (1964). ¹² Е. Г. Зезеров, Биохимия, **25**, 727 (1960). ¹³ R. Brunish, J. M. Luck, J. Biol. Chem., **197**, 869 (1952). ¹⁴ О. П. Самарина и др., Биохимия, **21**, 10 (1956). ¹⁵ R. H. Bradford, R. Shapiro, D. G. Doherty, Int. J. Rad. Biol., **3**, 595 (1964). ¹⁶ Г. В. Калистратов, Е. Ф. Романцев, Вопр. мед. хим., **11**, 38 (1965). ¹⁷ G. Kollmann, B. Shapiro, E. E. Schwartz, Ann. N. Y. Acad. Sci., **114**, art. 1, 602 (1964).