

УДК 612.398.145 (045)

БИОХИМИЯ

В. В. СОКОЛОВСКИЙ, Т. Ф. АТЯНИНА, А. И. СОРОКИН
**ОБ УЧАСТИИ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП
В КОНЬЮГИРОВАНИИ БЕЛКОВ С ЛИПИДАМИ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 13 XI 1972)

Интерес, проявляемый в настоящее время к изучению липопротеиновых комплексов (ЛПК), вызван их широким участием в процессах жизнедеятельности ⁽¹⁾. Протекающие в клетках явления физиологического и патологического порядка непосредственно связаны с образованием, существованием и распадом ЛПК, с особенностями их строения, и с их физико-химическими и биологическими свойствами ^(2, 3).

В механизме образования и диссоциации липопротеиновых комплексов важную роль играет природа связи липидов с белками.

Благодаря разнообразию состава и строения белкового и липидного компонентов, образование их комплексов может быть обусловлено силами электростатического притяжения ^(4, 5), неполярными взаимодействиями ^(6, 7), ковалентными связями ^(8, 9). Однако конкретный механизм взаимодействия между липидом и белком в ЛПК до сих пор остается столь же неясным, как и структура липидов и белков в этих комплексах ^(10, 11).

Имеющаяся информация о строении и свойствах ЛПК позволяет предположить участие некоторых функциональных группировок апопротеина, в частности SH-групп, в образовании надмолекулярной структуры ЛПК. Основанием для этого предположения служат данные о разрушении тиоловыми ядами клеточных мембран ⁽¹²⁻¹⁴⁾, о способности некоторых тиоловых соединений предупреждать деструкцию липопротеидов токсическими агентами ⁽¹⁵⁾, и, наконец, сведения о присутствии SH-групп в апопротеиновой части комплексов ^(16, 17).

Роль белковых SH-групп в формировании надмолекулярной структуры ЛПК, по-видимому, можно свести к их участию в образовании ковалентной связи с липидом по механизму, описанному Робинсоном ⁽⁸⁾, и к влиянию на прочность липопротеиновой связи, опосредованному через конформацию белковых макромолекул.

Используя в качестве рабочей гипотезы предположение об участии SH-групп в конъюгировании липидов с белками, мы изучали влияние тиоловых ядов окисляющего, алкилирующего и меркаптидообразующего типа действия на стабильность и структуру липопротеидов. В настоящем сообщении приведены результаты опытов, в которых агентами, блокирующими SH-группы, явились эндогенные для организма окисляющие вещества — перекись водорода и адrenoхром. Субстратами, содержащими липопротеиды, служили сыворотка крови и водно-солевые экстракты из гомогенатов печени и головного мозга белых мышей.

Для получения экстрактов готовили 2% суспензию тщательно измельченной свежей ткани на охлажденном фосфатном буфере (рН 6, 7; ионная сила 0,2) и через 30 мин. раствор липопротеидов отделяли центрифугированием.

Субстраты инкубировали в течение 60 мин. с растворами перекиси водорода (конечные концентрации $4 \cdot 10^{-2}$, $4 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$ М) и адренохрома

(конечная концентрация $1 \cdot 10^{-3} M$) при температуре 20° ; контрольный образец инкубировали с растворителем.

В первой серии опытов по окончании инкубации определяли остаточное содержание липопротеидов и сульфгидрильных групп. Для количественного определения липопротеидов использовали метод Делямуре ⁽¹⁸⁾, а также метод Бурштейна и Самой в описании А. А. Покровского ⁽¹⁹⁾. Количество реакционноспособных SH-групп измеряли амперометрическим титрованием ⁽²⁰⁾.

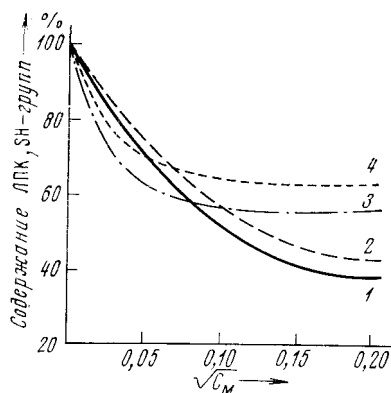


Рис. 1. Зависимость изменений содержания липопротеидов и SH-групп в экстрактах печени и мозга от концентрации перекиси водорода. SH-группы: печени (1) и мозга (3); β -ЛПК: печени (2) и мозга (4)

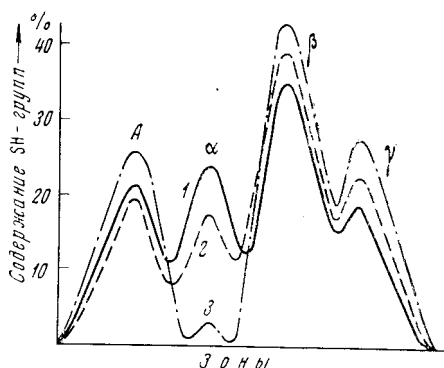


Рис. 3. Относительное содержание SH-групп в белковых фракциях экстракта печени после воздействия перекиси водорода и аденохрома. Средние из 10 электрофореграмм. 1 — контроль; 2 — H_2O_2 , $4 \cdot 10^{-3} M$; 3 — аденохром, $1 \cdot 10^{-3} M$

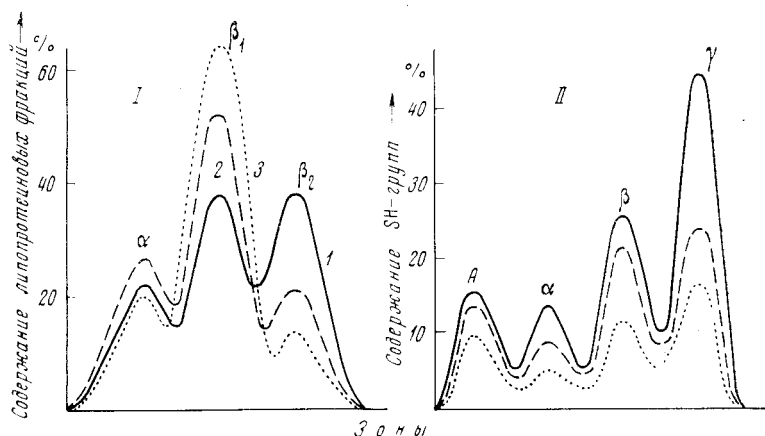


Рис. 2. Относительное содержание липопротеиновых фракций (I) и SH-групп (II) в сыворотке крови после воздействия перекиси водорода. Средние данные, полученные при анализе 10 электрофореграмм. 1 — контроль; 2 — H_2O_2 , $4 \cdot 10^{-3} M$; 3 — H_2O_2 , $4 \cdot 10^{-2} M$

Во второй серии опытов определяли на электрофореграмме относительное количество блокируемых окислителями сульфгидрильных групп в отдельных фракциях липопротеидов. С этой целью белки сыворотки крови и экстракта печени разделяли электрофорезом в агаре в двух параллельных пробах. На одной пластинке идентифицировали липопротеиды, окрашивая их суданом-черным по общепринятому методу. На другой пластинке

выявляли реакционноспособные SH-группы, применив для этого один из гистохимических способов ⁽²¹⁾. Предварительно блокировали свободные SH-группы белков β -оксинафтилмеркурийхлоридом до их разделения на фракции, а реакцию азосочетания проводили после разделения. Для определения относительного количества SH-групп в белковых фракциях измеряли интенсивность их окраски на сканирующем микрофотометре.

В опытах третьей серии оценивали степень повреждения ЛПК печени перекисью водорода при условии предварительного добавления к тканевому экстракту метионина или низкомолекулярных тиоловых соединений (β -меркаптоэтиламин, димеркаптопропансульфонат натрия или унитиол) в конечных концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ M.

Инкубирование сыворотки крови, экстрактов печени и мозга с перекисью водорода приводило во всех случаях к одному результату: ослаблению и разрыву липопротеиновых связей на фоне блокирования части реакционноспособных SH-групп. Характер этих изменений в разных субстратах был различен, что свидетельствует о разнообразии липопротеиновых структур, их строения и свойств.

Вместе с тем, однозначной для всех субстратов была корреляция между силой эффекта (блокирование SH-групп, распад ЛПК) и концентрацией вызывающего этот эффект вещества (рис. 1).

Некоторое повышение уровня SH-групп в экстракте печени под влиянием перекиси водорода в относительно низких концентрациях ($1 \cdot 10^{-4}$ M) было обусловлено, по-видимому, конформационными изменениями белковых структур и высвобождением в результате таких изменений части маскированных SH-групп ⁽²²⁾.

Однако и в этом случае наблюдалось ослабление липопротеиновой связи. Аналогичное действие оказывал адренохром: под его влиянием содержание SH-групп в сыворотке крови снижалось на 27%, общее содержание липопротеидов — на 13%, количество β -липопротеидов уменьшалось на 38%. Содержание SH-групп и ЛПК в экстрактах печени снижалось адренохромом на 18 и 20% соответственно.

В связи с выявлением упомянутой корреляции возник вопрос о том, в какой мере «тиолопривное» ⁽²³⁾ действие окислителей в условиях наших опытов затрагивает именно сульфгидрильные группы белкового компонента липопротеиновых комплексов.

Путем электрофоретического разделения липопротеидов с одновременной индикацией SH-групп белковых фракций на электрофореграмме установлено, что в сыворотке крови под влиянием перекиси водорода происходит частичный распад липопротеидов β -фракции (рис. 2, I) при одновременном блокировании значительной части SH-групп глобулиновых белков, в том числе являющихся апопротеиновой частью β -липопротеидов (рис. 2, II). В экстрактах печени при действии перекиси водорода и, особенно отчетливо, при действии адренохрома также имело место блокирование SH-групп белков, конъюгирующих с липидами; при этом оказалось, что окисленные сульфгидрильные группировки относятся к α -глобулинам. В других фракциях белков печени содержание SH-групп, наоборот, возрастало (рис. 3).

Выявлено также протекторное действие моно- и дитиолов (β -меркаптоэтиламина, унитиола) и аминокислоты метионина, которое выражалось в ослаблении в 2–2,5 раза эффекта деструкции ЛПК перекисью водорода при предварительном внесении в инкубационную смесь перечисленных веществ.

Сопоставление всех описанных фактов приводит к заключению об участии SH-групп апопротеина в механизме конъюгирования липидов с белками.

По-видимому, окисление сульфгидрильных групп приводит к ослаблению и разрыву липопротеиновых связей вследствие неизбежных при этом конформационных изменений белковой части комплекса.

Можно полагать, что биологическая активность окисляющих веществ при их нормальных или избыточных концентрациях в клетках в значительной мере обусловлена влиянием на структуру функционально важных ЛПН.

Ленинградский санитарно-гигиенический
медицинский институт

Поступило
13 XI 1972

Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева
Саранск

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. В. Троицкий, Химические основы процессов жизнедеятельности, 1962, стр. 34. ² С. И. Афонский, Биоконплексы и их значение, М., 1965, стр. 30. ³ А. Поликар, М. Бесси, Элементы патологии клетки, М., 1970. ⁴ Л. Хокки, М. Хокки, Молекулы и клетки, в. 2, М., 1967, стр. 60. ⁵ S. Curri, M. Vidali, *Biochim. e biol., sperim.*, 6, 3, 207 (1967). ⁶ Д. Е. Грин, Молекулярная биология. Проблемы и перспективы, «Наука», 1964, стр. 260. ⁷ A. Scauz, R. Hirz, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 59, 3, 290 (1968). ⁸ А. Н. Климов, Г. Н. Прохорова, Тр. Инст. эксп. мед. АМН СССР, 9, 3, 55 (1966). ⁹ J. Robinson, *Nature*, 212, 5058, 199 (1966). ¹⁰ Ф. Гауровиц, Химия и функции белков, М., 1965, стр. 286. ¹¹ D. Fredrickson, R. Levy, R. Lees, *New Engl. J. Med.*, 276, 1, 34 (1967); 276, 2, 94 (1967); 276, 4, 215 (1967); 276, 5, 273 (1967). ¹² В. В. Соколовский, Цитология, 4, 460 (1962). ¹³ В. В. Соколовский, Т. М. Соколовская, Современные проблемы биохимии дыхания и клиника. Матер. Всесоюзн. конфер., 2, Иваново, 1970, стр. 28. ¹⁴ В. В. Соколовский, Гистохимические исследования в токсикологии, Л., 1971, стр. 105. ¹⁵ Л. Янг, Д. Моу, Метаболизм соединений серы, М., 1961, стр. 54. ¹⁶ J. Buxtorf, J. Beaumont, *Pathol. Biol.*, 18, 11—14, 649 (1970). ¹⁷ R. Jammario, M. Humphrey, *Clin. Chem.*, 15, 12, 1218 (1969). ¹⁸ Л. Л. Делямуре, Лаб. дело, № 3, 141 (1964). ¹⁹ В сборн. Биохимические методы исследования в клинике. Под ред. А. А. Покровского, М., 1969, стр. 292. ²⁰ В. В. Соколовский, Лаб. дело, № 8, 3 (1962). ²¹ В. А. Яковлев, В. В. Соколовский, ДАН, 101, № 2, 321 (1955). ²² G. Varon, *Adv. enzymol.*, 11, 201 (1951). ²³ Z. Vasc, *Experientia*, 2, 349 (1946).