

Л. А. НОСКИН, А. Г. СВЕРДЛОВ, В. Н. ФОМИЧЕВ

О МЕХАНИЗМЕ ЗАЩИТЫ ГЛУТАМАТГИДРОГЕНАЗЫ
МЕКСАМИНОМ ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 27 XI 1972)

Высокая радиозащитная эффективность различных производных индолуксусной кислоты при облучении животных хорошо известна. Однако механизм действия этих соединений выяснен недостаточно. Наиболее распространена гипотеза о ведущем значении гипоксии, развивающейся в радиочувствительных органах под влиянием индолилалкиламинов. Однако эта гипотеза встречает ряд существенных возражений^(1, 2). В связи с этим целесообразно изучение радиозащитных эффектов различных производных индолилуксусной кислоты на молекулярном уровне, позволяющее уточнить важные стороны их действия. В этом плане интерес могут представить исследования защитного эффекта мексамина (5-метокситриптамина) при облучении ферментативных систем. В качестве такого фермента нами выбрана глутаматдегидрогеназа (ГДГ), свойства которой хорошо изучены, что облегчает интерпретацию результатов. Быстрота определения ферментативной активности, высокая степень очистки и доступность препарата создают дополнительные удобства при работе.

Методика. Глутаматдегидрогеназу (1-глутамат: НАД (НАДФ) оксидоредуктаза (деаминирующая), К. Ф. 1.4.1.3.) из печени крупного рогатого скота фирмы «Serva» предварительно диализовали 24 часа при температуре 4° против 2,5 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,6, содержащего 10^{-3} М ЭДТА. Объем диализата не превышал 1,0 мл; буфер в процессе диализа меняли дважды. После диализа ферментативный раствор разводили фосфатным буфером до нужной концентрации. Препарат в таком виде хранили в холодильнике не более 2 суток, за это время не наблюдалось существенного снижения ферментативной активности. Чистоту фермента контролировали по константе седиментации в ультрацентрифуге. Определение ферментативной активности проводили на саморегистрирующем 2-лучевом спектрофотометре фирмы «Specord». Предварительно в контрольную и рабочую кюветы наливали смесь, содержащую $5 \cdot 10^{-4}$ М НАД и 0,05 мг/мл ГДГ. После балансировки в рабочую кювету добавляли глутамат калия (0,1 мл) до конечной концентрации $2,5 \cdot 10^{-2}$ мол/л, тут же включали временную развертку самошисса и регистрировали скорость образования НАД-Н по приросту экстинкции на волне 340 мμ за первые 30 сек. реакции. Активность фермента выражали в виде прироста оптической плотности за 1 мин. на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури и по оптической плотности при 280 мμ. При расчете кинетических констант пользовались общепринятым построением Лайнуивера — Берка, а данные обрабатывали методом наименьших квадратов. Константы Михаэлиса для глутамата измеряли в диапазоне концентраций субстрата от 10^{-3} до 10^{-2} мол/л, так как более низкие и более высокие концентрации дают либо зашумленные, либо завышенные результаты, что связано с особенностями данной ферментативной реакции⁽³⁾. Все измеренные величины (максимальная скорость, число оборотов, константа Михаэлиса и константа седиментации) хорошо соответствовали значениям, которые известны для высокоочищенных препаратов ГДГ⁽⁴⁾.

Колоночную хроматографию со спектрофотометрической регистрацией выполняли на специально созданной для этих целей установке. Кон-

центрационная градуировка проводилась при 305 мр и 280 мр. Облучение образцов проводили на установке РХ-γ-30 при мощности дозы 20 крэд в 1 мин. Образцы в течение облучения термостатировали при температуре 4°. Объем образцов во всех случаях не превышал 1,0 мл. В отдельных экспериментах возникала необходимость создания анаэробных условий. Для этого образцы объемом не более 0,5 мл помещали в пробирки диаметром 50 мм. Через отверстия в резиновых пробках продували предварительно очищенный аргон, постоянно встряхивая пробирки.

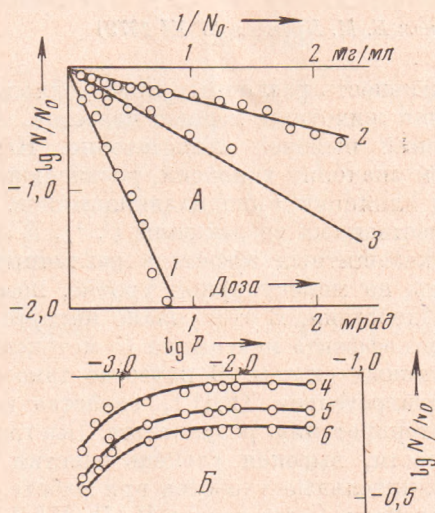


Рис. 1. Величина инактивации ГДГ в зависимости: А — от дозы (1, 2) и обратной концентрации фермента (3); Б — от концентрации мексамина в среде (концентрация ГДГ 1 мг/мл). 1 — концентрация ГДГ 1 мг/мл; 2 — концентрация ГДГ 1 мг/мл в присутствии мексамина 10^{-2} М; 3 — доза облучения 0,3 мрад; 4 — доза 0,8 мрад; 5 — доза 1,0 мрад; 6 — доза 1,2 мрад

Процесс освобождения от кислорода наблюдали прямым полярографическим методом, используя платиновый и каломельный электроды, приспособленные для микроизмерений. Чтобы не денатурировать растворенный белок, поток газа пропускали над слоем жидкости. Время продувки 15–20 мин. После этого пробирки герметизировали и образцы облучали.

Результаты исследований. Как видно из рис. 1А, зависимость инактивации фермента от дозы излучения носит экспоненциальный характер. В то же время величина инактивации экспоненциально зависит от обратной концентрации фермента. Добавление мексамина к ГДГ перед облучением обуславливает выраженный защитный эффект, что сказывается в изменении угла наклона экспоненты на дозовой кривой. Необходимо отметить, что присутствие мексамина не влияет на величину констант Михаэлиса K_M и V_M . Совокупность приведенных данных хорошо описывается уравнением простейшей радикальной инактивации фермента. Аналитическое выражение можно представить следующим образом:

$$\ln \frac{N}{N_0} = - \frac{K_1 D}{K_2 N_0 + K_3 P}, \quad (1)$$

где N_0 — концентрация ГДГ; P — концентрация мексамина; D — доза понизирующей радиации; K_1 , K_2 и K_3 — соответствующие кинетические коэффициенты.

Приведенное уравнение предусматривает линейную зависимость логарифма «выживаемости» фермента от значения обратной концентрации протектора. Однако, как показано на рис. 1Б, если облучаемый фермент имеет одну и ту же концентрацию, а содержание мексамина в среде варьирует, то, при некоторой концентрации протектора, можно наблюдать насыщение радиозащитного эффекта. Концентрация мексамина, при которой наступает это насыщение, не зависит от дозы облучения.

Объяснить описанный эффект присутствием в среде какого-либо третьего фактора, лимитирующего участие мексамина в перехвате радикалов, не представляется возможным. Опыт показывает (рис. 2), что зна-

чение насыщающей концентрации мексамина прямо пропорционально концентрации фермента. Это полностью исключает роль третьего фактора в эффекте насыщения. Естественно, возникает вопрос о том, не связаны ли особенности защитного действия мексамина с присутствием в пробах кислорода. Однако дополнительные исследования с предварительным удалением кислорода не выявляют заметного влияния этой модификации условий опыта на качественную и количественную характеристику защиты фермента мексamiном.

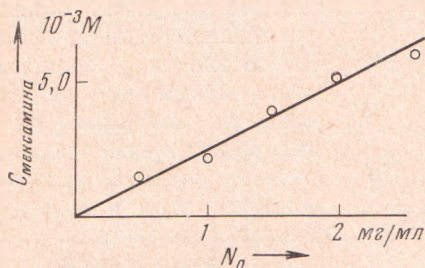


Рис. 2

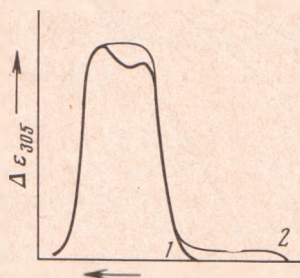


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость насыщающей концентрации мексамина (90% насыщение) от концентрации белка

Рис. 3. Колоночная хроматография ГДГ с мексamiном (концентрация $3,10^{-6}$ М и $5,10^{-4}$ М). 1 — мексамин, 2 — мексамин и ГДГ

Приведенные выше данные о насыщении защитного эффекта свидетельствуют, что аналитическое выражение модели простого конкурентного перехвата радикалов не адекватно описываемому процессу. К тому же закономерности защитного действия мексамина существенно отличаются от особенностей защиты перехватчиками радикалов. Сравнение влияний типичного перехватчика радикалов дитиотриэтола (ДТЭ) и мексамина выявляет, что при добавлении ДТЭ к облучаемому ферменту эффект насыщения защиты отсутствует (рис. 4). Пороговые значения защитных концентраций ДТЭ на порядок выше, чем мексамина. Все это заставляет искать другие объяснения механизма защитного действия мексамина при облучении ГДГ. Если предположить, что в основе этого механизма лежат процессы связывания протектора с некоторыми наиболее радиочувствительными участками молекулы ГДГ и защита последних от инактивации образующимися при облучении радикалами, то это удовлетворительно согласуется с выявленным эффектом насыщения. Непосредственным свидетельством такой возможности служат данные, полученные при колоночной хроматографии ГДГ с мексamiном. Условия колоночной хроматографии были выбраны так, что ГДГ элюировалась без задержанного объема впереди пика мексамина. При этом, если между обоими веществами нет никакого взаимодействия, то они будут выходить двумя строго очерченными пиками. Спектрофотометрию проводили на длине волны 305 мμ, т. е. следили только за пиками мексамина, так как белок в исследуемой концентрации не поглощал в этой области. При одновременном нанесении на колошку ГДГ с мексamiном выявлена четкая деформация (рис. 3, 2) переднего фронта пика элюции мексамина, что говорит о возможности связывания протектора с ГДГ.

Еще одним существенным аргументом в пользу представления о таком связывании является увеличение константы седиментации (к.с.) ГДГ в присутствии мексамина. По нашим данным, 30-кратный молярный избыток мексамина приводит к достоверному увеличению к.с. фермента с 17,6 до 18,22. Следует учесть, что эффект насыщения защитного действия отмечается при 1000-кратном молярном избытке мексамина, т. е. в этом случае вероятность связывания еще более возрастает.

Суммируя перечисленные факторы, можно считать связывание мексамина с ГДГ установленным. Возможно, что именно этим объясняется высокое (в сравнении с ДТЭ) радиозащитное действие мексамина, так как

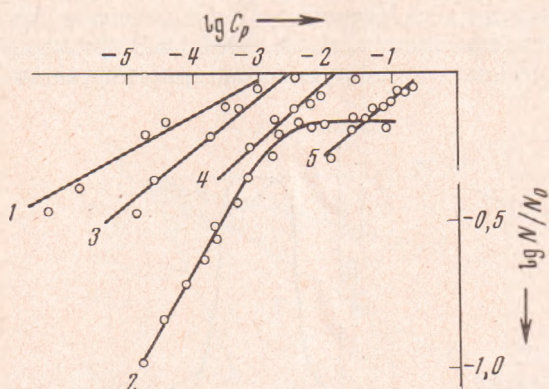


Рис. 4. Защита ГДГ (концентрация 1 мг/мл) при разных дозах облучения мексamiном (1, 2) и ДТЭ (3, 4, 5); 1 и 3 — доза 0,6 мрад; 2 и 4 — доза 1,2 мрад; 5 — доза 3,0 мрад

оно продолжает увеличение локальной концентрации протектора вблизи радиочувствительных точек молекулы белка. Вместе с тем, только связывание мексамина с ферментом не может объяснить все наблюдавшиеся эффекты.

В частности, зависимость точки насыщения защитного действия мексамина от концентрации фермента не позволяет считать связывание единственным или ведущим механизмом защиты.

Основные факты, установленные в описанных опытах, по-видимому, хорошо объясняются, если допустить, что мексамин связывается с ГДГ и обладает избиратель-

ным средством к одному из типов радикалов, образующихся при радиоллизе воды (окисляющим или восстанавливающим).

Кинетически инактивация фермента в условиях защиты при учете высказанного предположения описывается следующим образом:

$$\ln \frac{N}{N_0} = - \frac{K_2 D}{K_2 N_0 + K_3 P} - \frac{K'_2 D}{K'_2 N_0}, \quad (2)$$

где K_2 и K'_2 отражают средство активных и малоактивных радикалов к молекуле ГДГ, а K_1 и K'_1 — коэффициенты пропорциональности дозового выхода этих радикалов.

Как видно, это уравнение хорошо описывает наблюдавшиеся эффекты, в том числе эффект насыщения защитного действия, независимость его от дозы облучения и зависимость от концентрации ГДГ. Косвенным доказательством высказанного предположения являются данные по изучению методом э.п.р. радикалов, образующихся на белке при γ -облучении замороженных водных растворов альбумина (⁵). Они показывают, что присутствие мексамина качественно влияет на характер радикальных процессов.

Таким образом, при облучении альбумина выявляется влияние мексамина на характер радикальных процессов, согласующееся с предположениями об избирательном действии мексамина на радикалы с различными химическими свойствами.

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. С. Е. Бреслеру и С. В. Кириллову за помощь в работе, а также проф. Н. Н. Суворову за предоставленный в их распоряжение мексамин.

Ленинградский институт ядерной физики
им. Б. П. Константинова
Академии наук СССР

Поступило
27 XI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Г. Свердлов, Ю. Ф. Мартыничик и др., ДАН, 196, № 1, 220 (1971).
- ² П. Г. Жеребченко, Радиобиология, 2, № 6, 912 (1962).
- ³ P. G. Engel, K. Dalziel, In: Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases, Berlin, Heidelberg, N. Y., 1969, p. 246.
- ⁴ Th. E. Barman, Handbook Enzyme, Berlin, Heidelberg, N. Y., 1969, p. 631.
- ⁵ А. Г. Свердлов, В. Н. Фомичев и др., Тез. конфер. Действие понижающей радиации на белки и их структуру и функцию, Днепропетровск, октябрь, 1971 г., стр. 77.