

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.391;611.783

РОЛЬ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В РАДИАЦИОННОМ ПОРАЖЕНИИ
ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

Сичевская Л.В.

*Харьковский государственный университет,
пл. Свободы, 4, Харьков 310077*

Дата поступления в редакцию: 29 мая 1998 год

Исследовали интенсивность процессов перекисного окисления липидов, микровязкость свободных и аннулярных липидов, степень поляризации мембранных белков в норме и при γ -облучении в дозе до 10^3 Гр. Установлена взаимосвязь между уровнем радиационного поражения липидного компонента мембран и степенью структурной жесткости мембранных белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионизирующее излучение, эритроцитарные мембраны, вязкость аннулярных и свободных липидов, поляризация флуоресценции белков.

Биологические мембраны представляют собой кооперативные структуры, в которых любые структурные изменения отдельных компонентов вызывают нарушение структуры мембраны в целом [1]. Изменение микровязкости, упорядоченности, упаковки, а также состава фосфолипидов влияют на конформационное состояние и взаимодействие мембранных белков [2]. Поэтому представляло интерес проанализировать эффект радиационно-индуцируемых изменений липидной составляющей мембраны на структуру мембранных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазматические мембраны эритроцитов, свободные от гемоглобина, выделяли из донорской крови по методу [3].

Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре «Hitachi-850» (Япония) в термостатируемых при 25°C кварцевых кюветах.

Микровязкость липидов, непосредственно контактирующих с белковыми глобулами интегральных белков (аннулярные липиды) и свободных липидов, удаленных от глобул белка на расстояние более 3нм, определяли с помощью флуоресцентного зонда пирена (конечная концентрация зонда 15мкМ) [4]. При этом относительную вязкость липидов, удаленных от интегральных белков на расстояние более 3нм, оценивали по соотношению $\frac{F_M}{F_S}$, при $\lambda_b=319$ нм: где F_M - интенсивность флуоресценции мономеров пирена при 373нм; F_S - интенсивность флуоресценции эксимеров пирена при 493нм.

Относительную вязкость аннулярных липидов, определяли путем возбуждения пирена посредством индуктивно-резонансного переноса энергии с остатков триптофана мембранных белков ($\lambda_{\text{в}}=285\text{нм}$) и изменения степени эксимеризации.

Соотношение $\frac{F_M}{F_S}$ рассчитывали по формуле:

$$\frac{F_M}{F_S} = \frac{F_{373} - F_{373}^P}{F_{493} - F_{493}^P} \cdot \frac{0,825 - 0,175 \frac{\alpha}{\alpha + 1}}{0,825 - 0,175 \frac{1}{\alpha + 1}}$$

где: F_{373} - интенсивность флуоресценции при 373нм;

F_{493} - интенсивность флуоресценции при 493нм;

F_{373}^P - интенсивность флуоресценции остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 373нм;

F_{493}^P - интенсивность флуоресценции остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 493нм;

α - степени эксимеризации пирена при $\lambda_{\text{в}}=319\text{нм}$.

Флуоресценцию остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 373нм (F_{373}^P) и при 493нм (F_{493}^P) определяли по следующим зависимостям:

$$F_{373}^P = 0,224 \cdot F_{326}^P$$

$$F_{493}^P = 0,007 \cdot F_{326}^P$$

где: F_{326}^P - интенсивность флуоресценции остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 326нм.

Поляризацию флуоресценции триптофановых остатков мембранных белков определяли при $\lambda_{\text{возб}}=285\text{нм}$, $\lambda_{\text{фл}}=320\text{нм}$. Степень поляризации флуоресценции рассчитывали по формуле [5]:

$$P = \frac{F - F}{F + F}$$

F - интенсивность флуоресценции, когда поляризатор и анализатор ориентированы параллельно;

F - интенсивность флуоресценции, когда поляризатор и анализатор скрещены под прямым углом.

О динамике процессов перекисного окисления липидов судили по интенсивности накопления малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА определяли в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре СФ-46 при 535 нм ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$) [6]. Концентрацию белка определяли по методу [7]. Препараты мембран эритроцитов (0,5мг белка в 1мл 5мМ трис-НС1 буфере, рН 6,6) облучали на изотопной установке «Исследователь» (^{60}Co) в дозах 10, 10^2 , $5 \cdot 10^2$, 10^3 Гр. Вычисление коэффициента корреляции (r) осуществляли, используя программный пакет статистической обработки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Можно видеть (Рис.1), что воздействие ионизирующего излучения на плазматические мембраны эритроцитов стимулирует процессы ПОЛ, что подтверждает имеющиеся данные литературы [8]. Обращает на себя внимание

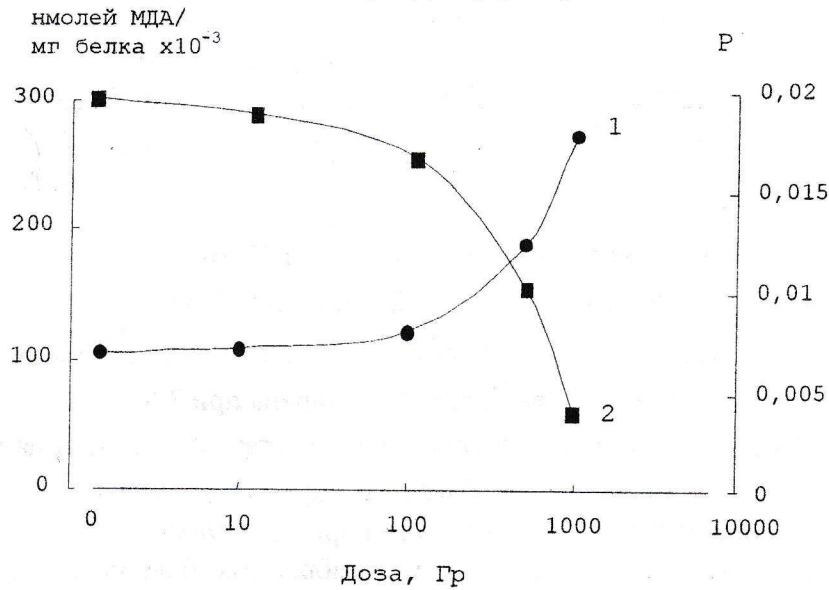


Рис.1. Влияние ионизирующего излучения на содержание МДА (1) и степень поляризации (P) белков эритроцитарных мембран (2).

двухфазный характер процесса: при облучении в дозе 10^2 Гр содержание МДА возрастает на 14%, по сравнению с необлученным контролем, а при увеличении дозы от 10^2 до 10^3 Гр содержание МДА возрастает на 133% ($p < 0,05$).

Облучение эритроцитарных мембран приводит к изменению микровязкости липидного компонента мембран (Рис.2). При этом характерна более высокая

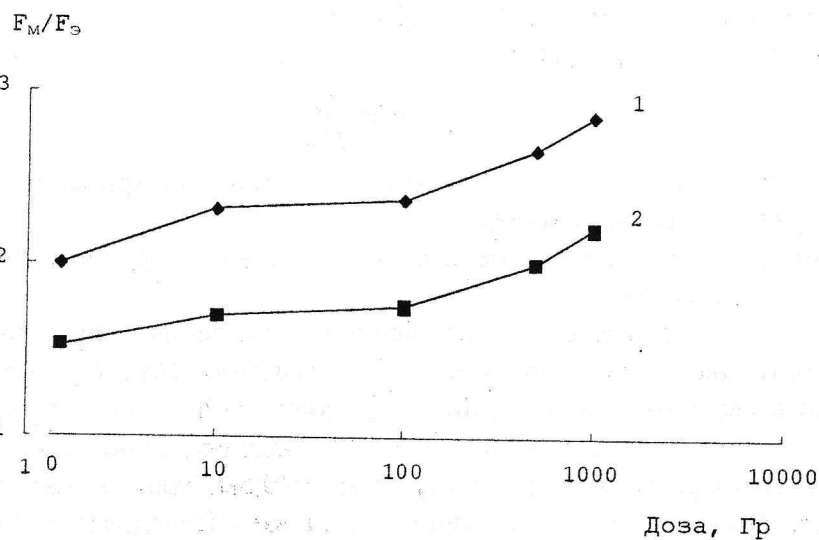


Рис. 2. Изменение микровязкости аннулярных (1) и свободных (2) липидов при воздействии радиации на плазматические мембраны эритроцитов.

микровязкость аннулярных липидов, по сравнению со свободными липидами на расстоянии более 3нм от интегральных белков, что хорошо согласуется с полученными ранее данными [9]. Облучение мембран в дозе 10^3 Гр приводит к возрастанию микровязкости свободных липидов на 42% ($p < 0,05$), а аннулярных липидов на 43% ($p < 0,05$), по сравнению с необлученным контролем. Расчетные величины коэффициента корреляции между содержанием МДА и микровязкостью липидного компонента составляет для аннулярных липидов 0,911, а для свободных липидов $r = 0,960$. Это свидетельствует о том, что липопероксидация ненасыщенных мембранных липидов приводит к возрастанию микровязкости аннулярных и свободных липидов [10].

Информативным подходом к исследованию структурной динамики мембранных белков является определение поляризации флуоресценции триптофанилов [11]. Определение поляризации флуоресценции триптофановых остатков белков эритроцитарных мембран показывает (Рис.1), что при облучении в дозе 10^3 Гр величина P уменьшается в 4,4 раза по сравнению с необлученным контролем, что указывает на ограничение подвижности белковых триптофанилов, то есть на повышение структурной жесткости белков эритроцитарных мембран [12]. Определение величины коэффициента корреляции между накоплением МДА и величиной P (-0,993) позволяет предположить, что характер радиационного поражения белков эритроцитарных мембран в значительной степени определяется радиационно-индуцированными процессами ПОЛ [13].

Известно [14], что перекиси липидов индуцируют образование межмолекулярных сшивок между продуктами ПОЛ и белками, а микровязкость липидного компонента мембран влияет на структурную подвижность белков [15]. На взаимосвязь между изменением микровязкости аннулярных и свободных липидов и величиной поляризации флуоресценции белковых триптофанилов указывают величины коэффициента корреляции: -0,942 и -0,981, соответственно. Очевидно, радиационно-индуцируемые процессы ПОЛ эритроцитарных мембран играют существенную роль в радиационном нарушении структурного состояния мембранных белков эритроцитов.

ВЫВОДЫ

Радиационное поражение эритроцитарных мембран проявляется в повышении микровязкости аннулярных и свободных липидов, обусловленное радиационно-индуцированными процессами ПОЛ и, как следствие, повышение структурной жесткости мембранных белков.

Можно полагать, что повышение структурной жесткости белков при гамма-облучении плазматической мембраны эритроцитов связано с возрастанием микровязкости аннулярных липидов, обусловленной процессами радиационно-индуцируемой липопероксидации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Конев С.В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. - Минск: Наука и техника, 1987.-193с.

2. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию // Издательство Московского университета.- 1990.-207с.
3. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes// Arch. Biochem. Biophys.-1963.-V.100.-p.119-130
4. Литвинов И.С., Образцов В.В.// Биофизика.-1982.- 27, вып.1.-с.81-86.
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.- М.: Наука, 1980.- 320с.
6. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.-М.: Наука, 1972.-252с.
7. Lowry O., Rosebrough W., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent// J.Biol.Chem.- 1951.-193, N2.-p.265-279.
8. Древаль В.И. // Электронная обработка материалов.- 1992.- №3.- с.42-44.
9. Lenaz G.// Biosci. Rep.- 1987.- v.7, N11.- p.823-837.
10. Nakazawa T., Nagatsuka S.// Int. j. Radiat. Biol.-1980.-38, N3.-p.537-544.
11. Бурштейн Э.А.// Молекулярная биология.- 1983.- 17, №3.- с.455-467
12. Фоменко Б.С.// Радиобиология.- 1983, т.23, №5.- с.607
13. Фоменко Б.С., Акаев И.Г.// Успех. совр. биол.- 1982, т.93, №2.- с.183-195.
14. Поливода Б.И., Конев В.В, Попов Г.А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.- М.: Энергоатомиздат, 1990.-160с.
15. Бурлакова Е.Б., Шишкина Л.Н.// Инф.бюл.Научн. совета АН СССР по проблемам радиобиологии.- 1989, №35.- с.11-12