

УДК 577.352.2/3;539.1;534.29

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТРАДИАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ПРИСУТСТВИИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ АГЕНТОВ

А.В. Финашин, В.Н. Ткаченко, В.В. Товстяк

Харьковский госуниверситет, 310077, Харьков, пл. Свободы, 4. E-mail: tovstiak@pem.kharkov.ua

Поступила в редакцию 15 ноября 1999 г.

Проведено исследование изменений активности дихлорфенолиндофенол- и феррицианидредуктаз микросом при облучении ускоренными электронами в дозах  $10^2$ - $10^4$  Гр. Достоверное ингибирование активности обеих оксидоредуктаз наблюдалось при дозе  $10^4$  Гр. Установлено, что радиационно-индуцированные эффекты не зависят от концентрации мембранного белка в диапазоне 0.23-2.3 мг/мл. Не обнаружено прямой корреляции между изменением активности ферментов и развитием процессов перекисного окисления липидов при облучении. Установлены закономерности влияния модификаторов структурного состояния мембран (трипон X-100, глутаровый альдегид и бутанол) на радиочувствительность оксидоредуктаз.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** оксидоредуктазы микросом, облучение, модификация радиочувствительности ферментов.

На современном этапе развития радиобиологии факт того, что плазматическая мембрана клетки является одним из объектов для радиационного воздействия не вызывает сомнения. Процессы, индуцируемые в плазмалемме облучением, исследовались с применением различных экспериментальных подходов к проблеме расшифровки молекулярных механизмов поражающего действия радиации на организм [1-3]. Однако, сосредоточение усилий радиобиологов только на изучении пострадиационных изменений наружной клеточной мембраны, даже с учетом ее многосторонних функциональных и регуляторных связей с клеточным метаболизмом, ограничивает возможности решения данной проблемы.

В этом аспекте особо следует отметить тот факт, что облучение оказывает генерализованное действие на клеточные мембраны, т.е. затрагивает не только плазмалемму, но и приводит к существенным сдвигам в нормальном функционировании любых внутриклеточных мембран. Индикатором подобных сдвигов может служить изменение активности мембраносвязанных ферментов при радиационном воздействии. По величине этого изменения, а также его знаку (ингибирование или активация ферментативной активности) можно судить о степени поражающего действия радиации на организм. В связи с этим особую актуальность приобретает изучение действия облучения на ферментные системы клеточных органелл.

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния ускоренных электронов на активность микросомальных оксидоредуктаз. Для выявления того, какой путь (прямой или опосредованный) преобладает в поражающем действии  $\beta$ -излучения на дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ)- и феррицианидредуктазу, исследовали зависимость степени радиационной инактивации данных мембраносвязанных ферментов от концентрации белка в суспензии микросом [4]. С целью ответа на вопрос о том, в какой мере за изменение активности оксидоредуктаз ответственны процессы радиационно-индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран эндоплазматического ретикулума, изучали влияние тиомочевины на функционирование этих белков при облучении мембранных суспензий. Исследовали также сдвиг пострадиационной активности микросомальных оксидоредуктаз в различные сроки после облучения (1 и 24 ч). Для лучшего понимания молекулярных механизмов, посредством которых структурно-динамическое состояние внутриклеточных мембран оказывает воздействие на наблюдаемые радиационные эффекты, был проведен ряд экспериментов с использованием мембранотропных агентов, таких как трипон X-100, глутаровый альдегид и бутанол.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали микросомную фракцию, выделенную из печени кролика [5]. Микросомы суспендировали в 10 мМ трис-НСI буфере (рН – 7.4). Содержание белка определяли по методу Лоури и соавт. [6]. Мембраны подвергали облучению электронами с энергией 5МэВ в дозах  $10^2$ - $10^4$  Гр. Перед измерением ферментативной активности оксидоредуктаз пробы инкубировали при  $4^\circ\text{C}$  в течение 1 или 24 ч. Ферментативную активность определяли как описано ранее [7]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу [8].

В качестве модификаторов структурного состояния мембран применяли трипон X-100, глутаровый альдегид и бутанол, добавление которых к суспензии микросом производили за 24 часа до облучения до конечных концентраций трифона X-100 – 0.05%, глутарового альдегида – 0.001% и бутанола – 0.3%. При выяснении вопроса о прямом или опосредованном пути воздействия радиации на микросомальные ферменты использовали суспензии с концентрацией мембранного белка 0.23 и 2.3 мг/мл. Интенсивность процессов

радиационно-индуцированного ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), используя коэффициент молярной экстинкции  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Для подавления процессов ПОЛ применяли тиомочевину, которую добавляли к суспензии микросом непосредственно перед облучением до конечной концентрации 100 мМ. Содержание МДА в мембранных препаратах определяли через 24 ч после радиационного воздействия по методу [5]. В течение этого времени пробы инкубировали при  $4^\circ\text{C}$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из представленной на рис. 1 дозовой зависимости ферментативной активности, оксидоредуктазы микросомальных мембран характеризуются низкой чувствительностью к радиационному воздействию. Через 1 ч после облучения достоверное снижение активности обоих ферментов наблюдалось только при дозе 10000 Гр. При этом следует отметить, что активность исследуемых микросомальных оксидоредуктаз ингибируется практически на одну и ту же величину (36% ингибирования для ДХФИФредуктазы и 37% – для феррицианидредуктазы по сравнению с необлученным контролем).

Полученные нами данные по ингибированию активности феррицианидредуктазы под влиянием радиации находят подтверждение в работе И.Е. Довгого с соавторами [9], в которой изучались изменения активности данного фермента после облучения выделенных эритроцитарных мембран. Авторы наблюдали при использовании доз 200–1000 Гр уменьшение активности феррицианидредуктазы на 50 % после 4-часовой инкубации мембран при  $37^\circ\text{C}$ . Отличие в дозе, при которой наблюдается радиационный эффект от полученных нами результатов, очевидно, объясняется различиями в структуре эритроцитарных и микросомальных мембран, а также условиями пострадиационной инкубации исследуемых мембранных суспензий. В нашем случае микросомную фракцию после облучения инкубировали в течение 1 часа при  $4^\circ\text{C}$ , поэтому закономерно, что для проявления радиационного эффекта необходима более высокая доза облучения (рис. 1).

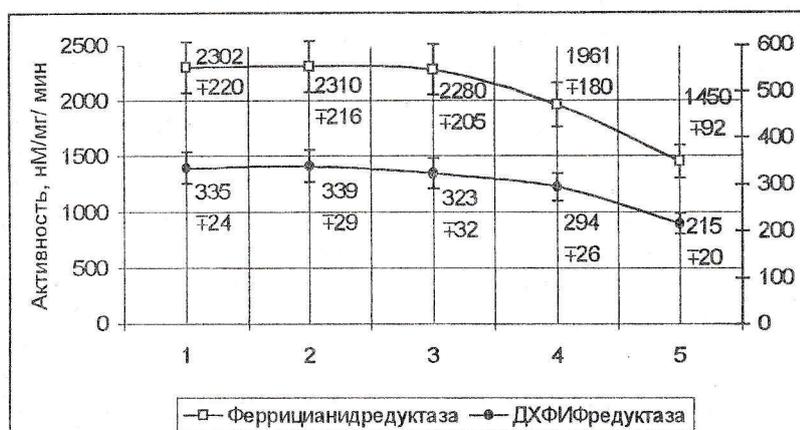


Рис. 1 Зависимость активности микросомальных оксидоредуктаз от дозы облучения. Доза облучения: 1 – контроль, 2 – 10 Гр, 3 –  $10^2$  Гр, 4 –  $10^3$  Гр, 5 –  $10^4$  Гр. Концентрация белка в облучаемой суспензии – 0.23 мг/мл.

Радиационно-индуцированные изменения активности мембранных ферментов могут объясняться влиянием различных факторов. Один из возможных молекулярных механизмов лучевого поражения клеточных мембран запускается посредством конформационных изменений мембранных белков. К выводу о решающей роли подобных конформационных изменений в реализации поражающего действия радиации в дозе 1000 Гр на мембраны эритроцитов пришли А.М. Тонгур с соавт. [10]. Следует отметить, что такие изменения конформации мембраносвязанных ферментов могут быть вызваны, в частности, разрушением определенных «ключевых» аминокислотных остатков при радиационном воздействии. Подтверждением этого может служить тот факт, что при использовании для образования планарных липидных мембран грамицидина Н, вместо грамицидина А, радиорезистентность ионных каналов таких искусственных липидных мембран существенно увеличивается. Объясняется подобное снижение чувствительности к облучению тем, что в молекуле грамицидина Н один из остатков триптофана заменен на остаток фенилаланина [11]. Также Довгий и соавт. [9] считают, что в ингибировании пострадиационной активности мембранного фермента феррицианидредуктазы процессы ПОЛ эритроцитарной мембраны не играют существенной роли. Пострадиационная инактивация данного фермента, по мнению авторов, объясняется структурными изменениями, индуцируемыми прямым действием облучения на белковую макромолекулу или связанными с перестройками липидной составляющей клеточной мембраны.

## Исследование пострадиационных изменений активности ...

Таким образом, одним из возможных путей радиационной инактивации для ДХФИФредуктазы и феррицианидредуктазы микросом может быть появление конформационных изменений в структуре этих белковых макромолекул, не связанное с перестройками липидной фазы микросомальных мембран под действием облучения. При этом действие радиации на ферменты может быть прямым или опосредоваться продуктами радиолиза воды. В связи с этим производили облучение быстрыми электронами в дозе 10000 Гр 2 типов суспензий микросом с концентрацией мембранного белка 0,23 и 2,3 мг/мл. Как следует из полученных данных (табл. 1) увеличение концентрации мембранного белка в 10 раз не приводит к статистически достоверным изменением пострадиационной активности ДХФИФредуктазы. Ингибирование ДХФИФредуктазной активности под действием облучения составляет  $\approx 33-36\%$  для обоих типов мембранных суспензий.

Исследование пострадиационных изменений активности другого изучаемого нами мембранного фермента микросом – феррицианидредуктазы, указывает на меньшую инактивацию в случае более концентрированной суспензии. Как видно из данных табл. 1, феррицианидредуктазная активность при облучении ингибируется в суспензии с концентрацией мембранного белка - 0,23 мг/мл на 35%. Для суспензии с концентрацией белка – 2,3 мг/мл этот показатель составляет 26%. Таким образом, понижение концентрации мембранного белка в облучаемой суспензии в 10 раз приводит к статистически достоверному увеличению ферментативной инактивации феррицианидредуктазы на 9%.

Таблица 1. Влияние концентрации мембранного белка и тиомочевины на степень радиационной инактивации ферментов.

Фермент	Состав среды суспендирования микросом	Концентрация белка, мг/мл	Ферментативная активность и ее относительное изменение	Контроль	Облучение в дозе $10^4$ Гр
НАДН: 2,6-ДХФИФредуктаза	10 мМ трис-НСI	0,23	1	$347 \pm 47$	$234 \pm 12$
			2	100	$67 \pm 3$
		2,3	1	$340 \pm 66$	$219 \pm 19$
			2	100	$64 \pm 6$
	10 мМ трис-НСI + 100 мМ тиомочевины	0,23	1	$339 \pm 29$	$224 \pm 12$
			2	100	$66 \pm 3$
НАДН: $K_3[Fe(CN)_6]$ -редуктаза	10 мМ трис-НСI	0,23	1	$3669 \pm 359$	$2419 \pm 101$
			2	100	$65 \pm 3$
		2,3	1	$3697 \pm 239$	$2724 \pm 120$
			2	100	$74 \pm 3$
	10 мМ трис-НСI + 100 мМ тиомочевины	0,23	1	$3280 \pm 120$	$2085 \pm 100$
			2	100	$64 \pm 3$
		2,3	1	$3614 \pm 239$	$2113 \pm 239$
			2	100	$58 \pm 7$

Примечание: 1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 – относительное изменение ферментативной активности, %

Ферментативную активность оксидоредуктаз регистрировали через 1 ч после облучения.

Однако, регистрируемое изменение столь мало, что не позволяет с полной уверенностью говорить о преобладании в действии быстрых электронов на феррицианидредуктазу продуктов радиолиза воды. Полученные экспериментальные данные не позволяют также абсолютизировать путь прямого влияния радиации на молекулы данного фермента. Аналогичные выводы можно сделать и в случае ДХФИФредуктазы.

Как уже говорилось выше, при рассмотрении вопроса о причинах радиационного поражения мембранных белков отсутствует единая, общепринятая точка зрения. Наряду с мнением об индуцировании структурных изменений при непосредственном действии радиации на молекулы ферментов, некоторыми исследователями выдвигается иное предположение. Суть его сводится к тому, что пострадиационная инактивация мембранных белков связана, главным образом, с радиационно-индуцированными перестройками в составе их непосредственного липидного окружения. Подтверждением такого объяснения молекулярных

механизмов воздействия лучевого фактора на активность мембраносвязанных ферментов служит тот факт, что внутренние интегральные мембранные белки, например, цитохром P<sub>450</sub>, сенсибилизированы к действию облучения в гораздо большей мере по сравнению с внешними, типа цитохрома b<sub>5</sub> и других [12]. Такое парадоксальное, на первый взгляд, пострадиационное изменение активности внутренних интегральных белков связано с их большей подверженностью влиянию запускаемых при облучении процессов ПОЛ клеточной мембраны. В целях дальнейшего обоснования своей точки зрения на причины поражения мембраносвязанных ферментов под действием радиации, авторами были проделаны работы по исследованию пострадиационных изменений активности мембранных белков в реконструированных микросомах. Липиды и ферменты, служившие исходным материалом для реконструкции микросом, облучались или не облучались в дозах 200-1000 Гр отдельно друг от друга. При этом предварительное облучение только белков с их последующим встраиванием в необлученную липидную фазу не оказывало влияния на ферментативную активность по сравнению с контрольными образцами. В отличие от этого, предварительное облучение одних липидов и формирование микросом из них и необлученных белков приводило к достоверному ингибированию активности ферментов [13,14].

Таким образом, одной из возможных причин пострадиационных сдвигов активности ДХФИФ- и феррицианидредуктаз может быть ПОЛ микросомальных мембран. Перекиси липидов могут непосредственно воздействовать на каталитические центры фермента, изменять ригидность мембраны, выступать в роли ингибиторов или аллостерических активаторов ферментативной активности [15-17]. Следует также отметить, что работы Б.И. Поливоды с соотр. свидетельствует о развитии процессов ПОЛ после облучения в дозах 25,5 Гр и выше в клеточных мембранах, выделенных из различных объектов [18,19]. При этом характерно, что химические прооксиданты приводят к таким же изменениям электрических и эластомеханических свойств мембраны, которые можно наблюдать после радиационного воздействия на нее [19]. Анализируя причину подобной схожести эффектов влияния прооксидантов и облучения на мембраны клеток, авторы полагают, что основной вклад в развитие пострадиационных патологических процессов клеточной мембраны вносит увеличение концентрации перекисей в липидной составляющей мембранного матрикса после радиационного воздействия.

В связи с вышесказанным, нами был проведен ряд экспериментов по исследованию роли ПОЛ микросомальных мембран в инактивации ДХФИФ- и феррицианидредуктаз при облучении мембранных суспензий быстрыми электронами в дозе 10000 Гр. Развитие процесса ПОЛ регистрировали по накоплению вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида. Как следует из данных, представленных на рис.2, радиационное воздействие приводит к существенному увеличению содержания МДА в исследуемых микросомальных суспензиях. При этом следует отметить, что увеличение концентрации белка мембран приводит к снижению концентрации МДА.

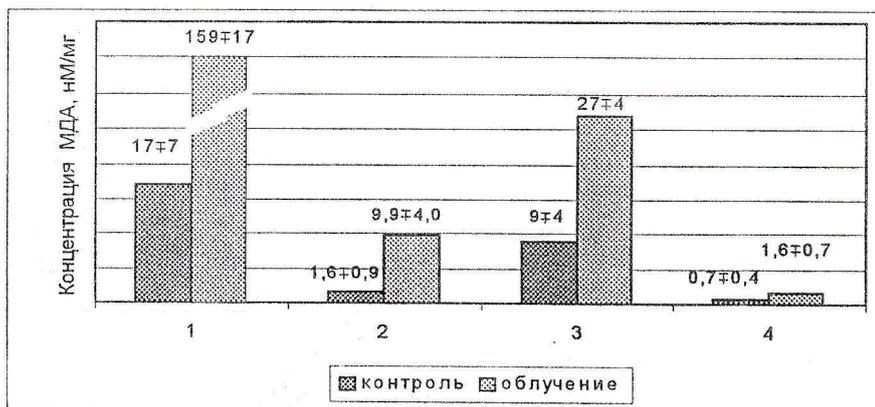


Рис.2. Изменение содержания МДА в облученных препаратах микросом в присутствии тиомочевины. Состав среды суспендирования: 1, 2 – 10 мМ трис-НСl; 3, 4 – 10 мМ трис-НСl + 100 мМ тиомочевины. Концентрация белка мембран: 1, 3 – 0,23 мг/мл; 2, 4 – 2,3 мг/мл.

Так для суспензии с концентрацией белка – 0,23 мг/мл наблюдается увеличение содержания МДА по сравнению с необлученным контролем в 9,3 раза. Аналогичный показатель для более концентрированного раствора составляет – 6,2. При введении в среду инкубации антиоксиданта – тиомочевины, образование МДА в значительной степени подавлялось. Из данных, представленных на рис.2, следует, что в присутствии тиомочевины, содержание МДА в облученной суспензии возрастает лишь в 3 раза в случае менее концентрированного раствора микросом. Исследуемый показатель для суспензии с концентрацией

## Исследование пострадиационных изменений активности ...

мембранного белка 2,3 мг/мл составляет величину 2,29. Таким образом, наблюдаемое снижение содержания МДА при добавлении 100 мМ тиомочевины свидетельствует о существенном подавлении радиационно-индуцированных процессов ПОЛ микросомальных мембран.

В тоже время исследование пострадиационных изменений ферментативной активности ДХФИФредуктазы не выявило влияния тиомочевины на характер этих изменений. Ингибирование активности данного фермента через 1 ч после облучения в присутствии тиомочевины сохраняется практически на прежнем уровне для обоих типов мембранных суспензий и составляет  $\approx 34-35\%$  (табл. 1). В случае феррицианидредуктазы наблюдается модификация радиационного эффекта для суспензии с концентрацией белка 2,3 мг/мл (табл. 1), проявляющаяся в дополнительном снижении ферментативной активности на 16%.

Изучался также временной аспект развития радиационного поражения ферментов микросомальной мембраны в суспензиях с концентрацией белка 0,23 мг/мл. Как следует из полученных экспериментальных данных (табл. 2) через 24 ч после облучения характер реакций обеих исследуемых оксидоредуктаз на радиационное воздействие отличается.

Таблица 2. Изменение активности оксидоредуктаз в различные сроки после облучения

Условия опыта	Ферментативная активность и ее относительное изменение	ДХФИФ-редуктаза	Феррицианид-редуктаза	ДХФИФ-редуктаза	Феррицианид-редуктаза
Контроль	1	347 ± 47	3669 ± 359	294 ± 20	1791 ± 120
	2	100	100	100	100
10 <sup>4</sup> Гр	1	234 ± 12	2419 ± 101	214 ± 16	1530 ± 105
	2	67 ± 3	65 ± 3	73 ± 5	85 ± 6
Контроль + тиомочевина	1	339 ± 29	3280 ± 120	323 ± 30	1450 ± 150
	2	100	100	100	100
10 <sup>4</sup> Гр + тиомочевина	1	224 ± 12	2085 ± 100	215 ± 24	768 ± 89
	2	66 ± 3	64 ± 3	67 ± 7	53 ± 6
Время пострадиационной инкубации, час		1		24	

Примечание: 1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 – относительное изменение ферментативной активности, %

Для ДХФИФ-редуктазы не регистрируется статистически достоверное изменение ферментативной активности. В отличие от нее, в случае феррицианидредуктазы наблюдается уменьшение ингибирования на 20%. Внесение тиомочевины в инкубационную среду до облучения приводит к обращению наблюдаемого эффекта (табл. 2). Через 24 ч после радиационного воздействия активность феррицианидредуктазы дополнительно ингибируется на 11%. Пострадиационная активность ДХФИФредуктазы в указанном временной интервале в пробах со 100 мМ тиомочевинной остается практически на том же уровне.

При сопоставлении данных, представленных на рис.2 и в табл.2, становится очевидно, что радиационно-индуцированное изменение активности обоих исследуемых микросомальных ферментов не коррелирует с изменением содержания МДА через 24 ч после облучения пучком ускоренных электронов. В облученных пробах с концентрацией МДА – 159 нМ/мг белка (рис.2) ингибирование ДХФИФ- и феррицианидредуктаз составляет 27 и 15% соответственно (табл. 2). В то же время в суспензиях с концентрацией МДА – 27 нМ/мг белка (рис.2) наблюдается значительно большее снижение пострадиационной активности данных ферментов. Активность ДХФИФредуктазы при добавлении тиомочевины уменьшается на 33%, для феррицианидредуктазы этот показатель составляет 47% (табл. 2). Внесение тиомочевины в концентрации 100 мМ, существенно подавляющей процессы ПОЛ микросомальных мембран, что и регистрируется по значительному снижению содержания МДА (рис.2), теоретически должно было оказывать на исследуемые оксидоредуктазы протекторное действие. Однако, данное предположение верно только для случая, когда ключевую роль в радиационном поражении микросомальных ферментов играют именно липидные перекиси. Полученные экспериментальные данные (табл. 2) по ингибированию пострадиационной активности ДХФИФ- и феррицианидредуктаз в присутствии тиомочевины позволяют сделать вывод, что процессы ПОЛ могут воздействовать на эти мембранные ферменты лишь косвенным образом, а основной вклад в поражающее действие радиации вносят иные молекулярные механизмы

взаимодействия облучения с биомембранами, реализуемые опосредованно, через изменение структурно-динамического состояния липидной фазы микросом.

Роль вязкости мембранных липидов в регуляции активности мембраносвязанных ферментов уже обсуждалась нами при интерпретации механизмов модификации радиационного воздействия на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу тений эритроцитов [20]. Несомненно, что динамические свойства непосредственного липидного окружения мембранных ферментов накладывают свой отпечаток на функционирование белковых макромолекул. При этом следует отметить, что физико-химические характеристики аннулярного кольца определяются не только структурой составляющих его липидов, но и структурой внутримембранной части интегрального белка, вокруг которого данное кольцо формируется [21]. Молекулярные взаимодействия погруженного в мембрану фрагмента интегрального белка и липидов непосредственного его окружения (белок-липидные взаимодействия) вносят свой вклад в регуляцию активности мембраносвязанных ферментов.

Механизм подобной регуляции, в общих чертах, сводится к тому, что под действием различных факторов может изменяться структурная упорядоченность липидов аннулярного кольца. Такое изменение вязкости этой липидной области влечет за собой изменение характера белок-липидных взаимодействий, и, как следствие этого, переход мембраносвязанного фермента из прежней функционально-активной конформации в новую конформацию с измененными каталитическими свойствами. Таким образом, посредством изменения динамических свойств липидного микроокружения мембранных белков, осуществляется локальная липидная регуляция ферментативной активности. При этом следует отметить, что пограничные липиды могут оказывать воздействие на функционирование мембраносвязанных ферментов как за счет кулоновских взаимодействий в области заряженной «головки» фосфолипидов, так и за счет слабых гидрофобных взаимодействий, возникающих между иммобилизованными ацильными цепями липидов и внутримембранными фрагментами интегральных белков [22].

В связи с вышеизложенным исследовали действие мембранотропных агентов – тритона X-100, глутарового альдегида и бутанола на активность микросомальных оксидоредуктаз при облучении быстрыми электронами в дозе 10000 Гр. Предварительно было изучено влияние различных концентраций тритона X-100 и глутарового альдегида на функционирование этих ферментов в норме [7]. Выбор именно таких агентов определялся тем, что для них характерно разнонаправленное действие на вязкость липидной фазы клеточных мембран.

Как следует из данных табл. 3 внесение тритона X-100 в микросомальные суспензии модифицирует эффект воздействия облучения на активность исследуемых оксидоредуктаз. Пострадиационное изменение активности ДХФИФредуктазы в присутствии тритона X-100 выражено в гораздо большей мере и составляет 51% ингибирования, в отличие от 35%-ного ингибирования, наблюдаемого в отсутствие детергента. Таким образом, внесение тритона X-100 в среду инкубации в концентрации – 0,05 %, усиливает эффект лучевого воздействия  $\approx$  в 1,5 раза. Аналогичная ситуация наблюдается и в случае радиационного поражения феррицианидредуктазы микросомальных мембран, предварительно проинкубированных с детергентом. При этом следует отметить, что тритон X-100 сенсibiliзирует данный фермент к действию облучения в существенно большей степени, чем ДХФИФредуктазу. Как видно из данных табл. 3 радиационная инактивация феррицианидредуктазы достигает при добавлении данного детергента величины 64%. В то же время немодифицированное тритоном X-100 облучение пучком ускоренных электронов, приводит к уменьшению ферментативной активности лишь на 38%. Полученные экспериментальные данные указывают на увеличение радиационного эффекта в присутствии данного детергента в 1.7 раза.

Вышеописанные явления хорошо укладываются в рамки той гипотезы о механизме модифицирующего действия тритона X-100, которая выдвигалась при интерпретации радиационного поражения  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитарных мембран, обработанных этим детергентом [20]. Очевидно, что в основе молекулярных механизмов повреждающего действия радиации в случае микросомальных оксидоредуктаз, также лежит изменение структурно-динамических свойств ближайшего липидного окружения данных мембраносвязанных ферментов, так как модификация этих свойств тритоном X-100 приводит к усилению радиационной инактивации. Тритон X-100, встраиваясь в микросомальные мембраны и модифицируя характер собственных ферменту в норме белок-липидных взаимодействий, дестабилизирует белковую макромолекулу, что влечет за собой снижение радиорезистентности. По-видимому, действие детергента, опосредованное ближайшим липидным окружением фермента, сводится к индуцированию конформационных изменений белковой глобулы. Измененная конформация, хотя и отличается большей каталитической активностью, в то же время характеризуется гораздо меньшей устойчивостью к повреждающему действию радиации (табл. 3).

Следует также отметить, что согласно имеющимся представлениям о роли липидов аннулярного кольца, эти липиды могут служить аллостерическими эффекторами [23]. Вытеснение тритоном X-100 липидов – ингибиторов из непосредственного окружения белковой молекулы могло бы, по принципу аллостерической регуляции, приводить к изменениям структурно – стерических свойств активного центра оксидоредуктаз, направленным на усиление каталитической активности. Как известно, взаимодействие пространственно разобщенных аллостерического и активного центров фермента может осуществляться лишь посредством конформационных изменений молекулы белка в целом. Возникающая при нарушении исходной

аллостерической регуляции под влиянием тритона X-100, измененная конформация оксидоредуктаз обладает большей чувствительностью к действию быстрых электронов. Однако, предположения о вмешательстве детергента в механизм аллостерической регуляции оксидоредуктаз микросомальных мембран требуют дополнительной экспериментальной проверки.

Таблица 3. Изменение пострадиационной активности микросомальных оксидоредуктаз в присутствии мембранотропных агентов

Мембранотропный агент	Условия опыта	Ферментативная активность и ее относительное изменение	ДХФИФ-Редуктаза	Феррицианид-редуктаза
Без добавки	Контроль	1	108,3 ± 0,8	1019 ± 83
		2	100	100
	10 <sup>4</sup> Гр	1	70,4 ± 3,2	632 ± 20
		2	65 ± 3	62 ± 2
Тритон X-100	Контроль	1	120 ± 1,0	1783 ± 107
		2	100	100
	10 <sup>4</sup> Гр	1	59 ± 2,4	642 ± 36
		2	49 ± 2	36 ± 2
Глутаровый альдегид	Контроль	1	107 ± 7	1015 ± 30
		2	100	100
	10 <sup>4</sup> Гр	1	60 ± 3	325 ± 30
		2	56 ± 3	32 ± 3
Бутанол	Контроль	1	172 ± 7	1421 ± 123
		2	100	100
	10 <sup>4</sup> Гр	1	94 ± 3	526 ± 65
		2	55 ± 2	37 ± 5

Примечание: 1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 – относительное изменение ферментативной активности, %

Ферментативную активность измеряли через 1ч после облучения в пробах с концентрацией белка – 0,23 мг/мл.

Действие глутарового альдегида на клеточную мембрану, как уже упоминалось нами в работе [20], противоположно влиянию тритона X-100. Из данных табл. 3 видно, что, несмотря на то, что данный «сшивающий» мембранные белки агент, сам по себе угнетает ферментативную активность оксидоредуктаз [7], его модифицирующее воздействие на ДХФИФредуктазу при облучении выражено слабо. В присутствии глутарового альдегида ингибирование достигает 44%, т.е. увеличивается на 9% по сравнению с величиной радиационной инактивации в микросомальных суспензиях без добавки модификатора. В то же время чувствительность феррицианидредуктазы к облучению пучком ускоренных электронов, под влиянием глутарового альдегида существенно возрастает. При наличии в среде инкубации микросомальных суспензий 0,001%-ной концентрации глутарового альдегида, пострадиационное уменьшение активности данного фермента, достигает 68%. Таким образом, в случае феррицианидредуктазы, под действием модификатора наблюдается дополнительная радиационная инактивация на 30 %. Из данных табл. 3 следует, что эффект облучения, полученный в присутствии глутарового альдегида, для феррицианидредуктазы выражен в 1,5 раза больше, чем для ДХФИФредуктазы.

Как уже упоминалось [20], глутаровый альдегид, взаимодействуя с N-концевыми фрагментами мембранных белков, структурирует клеточную мембрану, модифицируя за счет этого характер белок-липидных взаимодействий. Эта модификация влияет, главным образом, на слабые, дисперсионные взаимодействия, ответственные за иммобилизацию ацильных цепей липидов, и приводит к более плотной упаковке «хвостов» жирных кислот в белково-липидном матриксе. За счет этого наблюдается усиление дисперсионных взаимодействий и ограничение всех видов подвижности белка в клеточной мембране. Молекулярный механизм влияния глутарового альдегида на активность микросомальных оксидоредуктаз сводится, по-видимому, к тому, что в структурированной модификатором мембране молекула белка, под действием увеличившихся дисперсионных сил, претерпевает конформационный переход. Конформационные изменения

распространяются, в том числе, и на активный центр, модулируя его структурно-стерические свойства таким образом, что каталитическая активность фермента уменьшается [7]. Такая измененная конформация белковой молекулы, очевидно, не является нативной, свойственной белку при нормальных условиях его функционирования в клеточной мембране. Поэтому чувствительность оксидоредуктаз к поражающему действию радиации под влиянием глутарового альдегида увеличивается, что особенно ярко выражено в случае феррицианидредуктазы. При этом следует отметить, что за счет «сшивания» N-концевых фрагментов мембранных белков и усиления дисперсионных взаимодействий с ацильными цепями липидов, молекула фермента, при ограничении различных видов подвижности белка в мембране, как бы «фиксируется» в данной измененной, сенсibilизированной к радиационному воздействию конформации. Подобная стабилизация радиочувствительной конформации оксидоредуктаз под влиянием глутарового альдегида, может вносить дополнительный вклад в снижение радиорезистентности этих мембраносвязанных ферментов.

В отличие от глутарового альдегида, мембранотропное действие бутанола на клеточные мембраны характеризуется снижением вязкости липидной фазы в присутствии данного органического растворителя. Как следует из данных табл. 3 внесение бутанола в инкубационную среду в концентрации 0,3% приводит к активации ферментативной активности оксидоредуктаз микросомальных мембран, которая более выражена для ДХФИФредуктазы. Под влиянием бутанола активность данного фермента возрастает на 59%, т.е. в 1,6 раза. В случае феррицианидредуктазы наблюдается увеличение активности на 39%. Таким образом, активирующий эффект бутанола для данного фермента в 0,7 раза меньше, чем для ДХФИФредуктазы.

Вышеописанное влияние бутанола на функционирование этих мембраносвязанных ферментов может объясняться тем, что в соответствии с данными литературы [24], органические растворители сами по себе взаимодействуют с белками за счет образования водородных связей с соответствующими группами, что сопровождается, в частности, разрывом гидрофобных контактов и водородных связей в белковой глобуле. Результатом этого может быть «разрыхление» молекулы энзима, сопровождающееся увеличением его каталитической активности.

Облучение микросомальных суспензий быстрыми электронами в дозе 10000 Гр резко изменяет наблюдаемую картину. Модификация радиационного воздействия 0,3%-ной концентрацией бутанола приводит к дополнительной инактивации исследуемых оксидоредуктаз, причем радиационный эффект более выражен в случае феррицианидредуктазы (табл. 3). Для ДХФИФредуктазы ингибирование пострадиационной активности в присутствии бутанола достигает 45%, т.е. увеличивается на 10% по сравнению с немодифицированным действием облучения. Радиационная инактивация феррицианидредуктазы, при предварительном внесении в инкубационную среду органического растворителя, составляет 63%, таким образом наблюдается дополнительное уменьшение ферментативной активности на 25%. Из полученных экспериментальных данных следует, что радиационный эффект, наблюдаемый в присутствии бутанола, для феррицианидредуктазы в 1,4 раза больше по сравнению с ДХФИФредуктазой. При этом следует отметить, что дополнительное пострадиационное уменьшение активности феррицианидредуктазы, вызванное влиянием органического растворителя, в 2,5 раза больше аналогичного показателя другой исследуемой оксидоредуктазы.

Действие бутанола на липидную фазу клеточных мембран в определенной мере схоже с влиянием неионогенного детергента тритона X-100, за исключением невозможности встраивания данного органического растворителя в белково-липидный матрикс. При внесении бутанола в инкубационную среду микросомальных суспензий происходит ослабление липид-липидных взаимодействий клеточной мембраны, что приводит к уменьшению вязкости липидной фазы. Подвижность ацильных цепей белково-липидного матрикса вследствие этого возрастает. Можно предположить, что подобные изменения характера липид-липидных взаимодействий генерализуются и оказывают определенное влияние на непосредственное липидное окружение исследуемых оксидоредуктаз. Конечным результатом вышеописанных процессов является ослабление взаимодействия белковой макромолекулы с липидами аннулярного кольца, приводящее к увеличению внутримолекулярной подвижности глобулы белка. Конформационные переходы, которые может претерпевать при этом молекула фермента, приводят, по-видимому, к такому изменению ее структурной организации, что радиорезистентность белка уменьшается. Возможен также и другой механизм радиационной инактивации исследуемых оксидоредуктаз. Увеличение внутримолекулярной подвижности белковой молекулы служит основой для индуцируемых облучением конформационных изменений. Радиационные повреждения независимо от места их возникновения в белковой глобуле, за счет возросшей внутримолекулярной подвижности, преобразуют ее структурную организацию таким образом, что в конечном итоге повреждают активный центр фермента, вызывая уменьшение его каталитической активности. Вышеописанный механизм мог бы реализовываться при непосредственном действии быстрых электронов на мембраносвязанные белки в присутствии бутанола.

## ВЫВОДЫ

В поражающем действии радиации на ДХФИФ- и феррицианидредуктазу микросомальных мембран процессы ПОЛ не играют существенной роли. Механизм влияния быстрых электронов на функционирование исследованных ферментных систем реализуется, главным образом, через липидную фазу внутриклеточных

мембран. К дополнительным факторам инактивации оксидоредуктаз относятся как непосредственное воздействие излучения на них, так и опосредованное продуктами радиолиза воды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandra S., Stefani S. // *Int. J. Radiat. Biol.*-1981.-V.40, N3.- P.305-311.
2. Павловская Т.Е., Тонгур А.М., Волкова М.С. // *Информ. бюл. Науч. совета АН СССР по пробл. радиобиологии.*-1983.-N 27.- С.32-34.
3. Рыскулова С.Т. Радиационная биология плазматических мембран.- М.: Энергоатомиздат, 1986.- 128 с.
4. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Радиационная биофизика – М.: Изд-во МГУ, 1979.- 240с.
5. *Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича.* – М.: Медицина, 1987. – 391 с.
6. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // *J.Biol.Chem.*-1951.-V.193, N1.- P.265-285.
7. Ткаченко В.Н., Горбенко Г.П., Курилко С.А., Товстяк В.В. // *Укр. биохим. журн.*- 1996.-Т.62, № 4.- С. 105-108.
8. Кокунин В.А.// *Укр. биохим. журн.*- 1975.-Т. 47.- С. 776-791.
9. Довгий И.Е., Фоменко Б.С., Акоев И.Г. // *Радиобиология.*-1983.-Т.23, вып. 1.-С.71-74.
10. Тонгур А.М., Павловская Т.Е., Губина Н.Б. // *Радиобиология.*-1983.-Т.23.-С.35-38.
11. Strussle M., Stark G., Wilhelm M.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1987.-V.51.- P.265-286.
12. Yukawa O., Nakazava T.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1980.-V.37.- P.621-631.
13. Yukawa O., Nagatsuka O., Nakazava T.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1983.-V.43.- P.391-398.
14. Yukawa O., Miyahara M., Shiraishi N., Nakazava T.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1985.-V.48.- P.107-115.
15. Владимирюв Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: - Наука, 1972.-252 с.
16. Каган В.Е., Котелевцев С.В., Козлов Ю.П. // *Труды АН СССР*, 1974.-Т. 217, № 1.-С. 213-216.
17. Туровецкий В.Б. Перекисное окисление липидов и функционирование дыхательной цепи митохондрий. Автореф. дис... канд. биол. наук.- М.: - МГУ, 1975.
18. Поливода Б.И., Конев В.В // *Радиобиология.*-1986.-Т.26, N 6.- С.803-805.
19. Поливода Б.И. Биофизические аспекты радиационного поражения клеточных мембран в ранние сроки после облучения. Автореф. докт. дис.- Обнинск, 1982.-43 с.
20. Финашин А.В., Товстяк В.В.// *Биофизический вестник*, 1999.- Вып.4(2).-С.45-52.
21. *Текучесть мембраны в биологии: концепции мембранной структуры / Под ред. Р. Элойа.*- Киев.: Наук. думка, 1989.-312 с.
22. Дергунов А.Д., Капрельянц А.С., Островский Д.Н. // *Усп.биол.химии.*-1984.-Т.25.-С.89-109.
23. Jurtshuck P., Sekuru I., Green D.E. // *Biochem.and Biophys. Res. Communs.*- 1961.- V 6., №1.-P.76-81.
24. Узбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма.- М.:Мир, 1966.- 862 с.