

## Влияние радиации на перекисное окисление липидов и окисление SH-групп мембранных белков

В. И. Древаль

Харьковский университет  
310077 Харьков, пл. Дзержинского, 4

*Суспензию плазматических мембран тимоцитов облучали в дозах  $5-10^4$  Гр. Определяли перекисное окисление липидов, содержание SH-групп в мембранных белках и влияние на эти процессы цистамина, ионола и этанола. Полученные данные позволяют предположить, что радиационно-индуцируемая липопероксидация обусловлена как прямым действием радиации на липиды, так и взаимодействием липидов с продуктами радиолитического распада воды радикалами  $\text{OH}^\bullet$ . Окисление SH-групп в белках зависит от процессов перекисного окисления мембранных липидов.*

**Введение.** В биологических средах вода является основным растворителем и ее радикалы играют важную роль при действии ионизирующего излучения на организм [1]. Вместе с тем в биологических мембранах в качестве растворителя (гидрофобного) выступают и липиды [2]. Таким образом, при воздействии ионизирующего излучения на биомембраны можно ожидать эффекты, обусловленные как радиолитическим расходом воды, так и радиационно-индуцируемым изменением липидов. Поэтому представляло интерес оценить вклад этих процессов в явление радиационно-индуцируемого перекисного окисления липидов и окисления SH-групп мембранных белков.

**Материалы и методы.** В опытах использовали плазматические мембраны тимуса крупного рогатого скота [3].

Суспензию плазматических мембран (1,2 мг белка в 1 мл) облучали на линейном ускорителе электронов (энергия 5 МэВ, мощность дозы 120 Гр/мин) в дозах  $5-10^4$  Гр.

Содержание белка определяли по методу Лоури и соавт. [4] на спектрофотометре СФ-46 при 750 нм. Процессы перекисного окисления липидов регистрировали спустя 2 ч после облучения по накоплению в среде малонового диальдегида (МДА) в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при 535 нм,  $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [5]. Одновременно содержание SH-групп в мембранных белках определяли при титровании *n*-хлормеркурибензоатом (ПХМБ) [6]. Статистическую обработку данных с использованием *t*-критерия Стьюдента и расчеты коэффициента корреляции (*r*) проводили по методу [7].

**Результаты и обсуждение.** При воздействии ионизирующего излучения на биологические мембраны наблюдается накопление МДА, что указывает на активацию процессов перекисного окисления липидов при действии радиации (рис. 1). Это подтверждает полученные ранее данные о том, что при облучении *in vitro* суспензии ядер, митохондрий, микросом и лизосом в них наблюдается возрастание перекисного окисления липидов [8, 9].

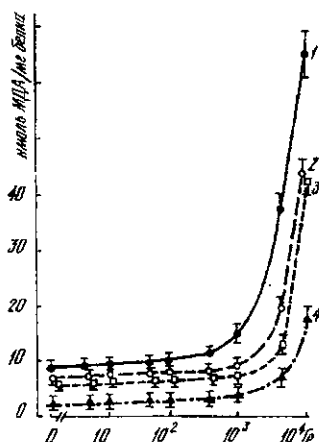


Рис. 1. Влияние облучения плазматических мембран тимоцитов на накопление МДА (1); в присутствии цистамина (2); этанола (3) и ионола (4) ( $n = 11$ ,  $M \pm m$ )

Если сам факт усиления липопероксидации при облучении мембран не вызывает сомнений, то механизм запуска этого процесса еще до конца не выяснен. Возрастание перекисного окисления липидов в биомембранах под действием радиации может быть обусловлено как радикалами, возникающими в липидах мембран вследствие прямого действия ионизирующего излучения, так и образующимися в воде радикалами, атакующими двойные связи жирных кислот. Чтобы решить этот вопрос, мы исследовали влияние на радиационно-индуцируемое перекисное окисление липидов ионола, этанола и цистамина, которые вводили в суспензию мембран за 1 ч до облучения.

Известно, что облучение липидных эмульсий в присутствии различных серусодержащих белков вызывает заметное снижение количества липидных перекисей по сравнению с облученными эмульсиями без белка [10]. В эритроцитах интенсивность процессов перекисного окисления липидов снижалась в присутствии серусодержащих протекторов [11]. В связи с этим в наших исследованиях перед облучением в суспензию мембран вводили раствор цистамина  $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}]_2 \cdot 2\text{HCl}$  в воде из расчета 20 мкмоль на 1 г мембранного белка [12]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение цистамина (рис. 1) приводит к уменьшению содержания МДА и при дозе облучения  $10^4$  Гр этот показатель снижается в 1,5 раза по сравнению с препаратом мембран без цистамина. Это подтверждает имеющиеся сведения об ингибировании серусодержащими соединениями процессов перекисного окисления липидов [13].

В процессе радиолитического разложения воды образующиеся радикалы  $\text{OH}\cdot$  способны эффективно и неизбирательно атаковать любые связи белков, липидов и углеводов [14]. Поэтому, чтобы оценить вклад  $\text{OH}\cdot$ -радикалов в эффект перекисного окисления липидов, к суспензии мембран перед облучением добавляли этанол в конечной концентрации 0,5 М, который в нейтральной среде является «перехватчиком» радикалов  $\text{OH}\cdot$  [15]. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что этанол ингибирует процессы перекисного окисления липидов. При дозе  $10^4$  Гр содержание МДА снижается в 1,5 раза ( $P < 0,05$ ) по сравнению с необлученным контролем. Это позволяет сделать вывод о том, что определенный вклад в процессы радиационно-индуцированного перекисного окисления липидов вносят эффекты радиолитического разложения воды.

Эффективным ингибитором перекисного окисления липидов является растворимый в липидной фазе мембран 2,6-ди-трет-бутил-*n*-крезол (ионол) [16]. Раствор ионола (конечная концентрация 50 мкМ) в этаноле перед облучением вводили в суспензию мембран [17] за 1 ч до облучения. Можно видеть, что введение ионола в гораздо большей мере (рис. 1) ингибирует процессы перекисного окисления липидов по сравнению с этанолом и

цистамином. При дозе  $10^4$  Гр содержание МДА уменьшается в 3,7 раза ( $P < 0,01$ ) относительно препарата, не содержащего ионола. Эти результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные о том, что введение в суспензию митохондрий ионола вызывает снижение уровня перекисного окисления липидов по сравнению с облученным контролем [8].

Известно, что макромолекулы, содержащие SH-группы (сульфгидрильные ферменты, гистоны), играют большую роль в метаболизме, в частности, в столь уязвимых радиацией процессах, как синтез белков и нуклеиновых кислот, окислительное фосфорилирование, проницаемость клеточных мембран и т. д. [18].

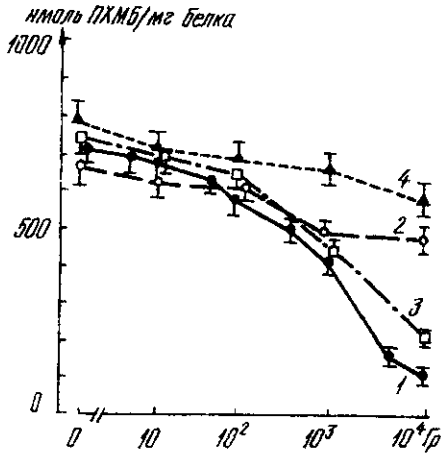


Рис. 2. Влияние ионизирующего излучения на содержание SH-групп в мембранных белках. Обозначения, как на рис. 1. По оси ординат — количество ПХМБ, использованного при титровании SH-групп мембранных белков

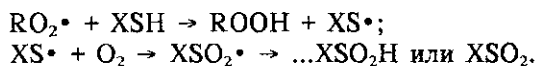
Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что возрастание дозы облучения сопровождается резким снижением количества SH-групп в мембранных белках. Так, при дозе  $10^4$  Гр их количество уменьшается на 83 % по сравнению с необлученным препаратом плазматических мембран. Наши результаты качественно хорошо согласуются с наблюдавшимся уменьшением количества SH-групп в суспензии митохондрий [8], ядрах, лизосомах и микросомах [19] после воздействия ионизирующего излучения. Окисление белковых SH-групп относится к поражению кислородного типа и в анаэробных условиях не осуществляется [20]. Таким образом, полученные данные показывают, что после облучения происходит снижение количества SH-групп, очевидно, за счет радиационно-химических реакций.

Поскольку мембранные белки растворены в липидной фазе мембран, а также экспонированы в водную среду, можно полагать, что наблюдаемый эффект уменьшения числа SH-групп обусловлен как влиянием радиационно-индуцированного перекисного окисления липидов, так и действием продуктов радиоллиза воды. Для выявления вклада различных процессов в эффект окисления SH-групп белков плазматических мембран в суспензию мембран за 1 ч перед облучением вводили какой-либо из трех препаратов: цистамин, ионол или этанол.

Можно видеть (рис. 2), что добавление перед облучением цистамина приводит к предохранению SH-групп: при дозе  $10^4$  Гр количество SH-групп уменьшается на 30 % по сравнению с необлученным контролем.

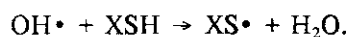
Введение ионола вызывает снижение количества титруемых SH-групп на 28 % при дозе  $10^4$  Гр (рис. 2). Это свидетельствует об определенном вкладе процесса перекисного окисления липидов в эффект радиационно-индуцированного окисления SH-групп мембранных белков. На зависимость этого эффекта от липопероксидации указывает величина коэффициента корреляции  $r = -0,971$ . Полагают, что повреждение сульфгидрильных групп происходит не за счет действия гидроперекисей и других молекулярных

продуктов окисления ненасыщенных жирных кислот, а в результате реакции со свободными радикалами [5]:

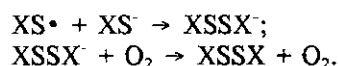


Этот механизм может определять наблюдаемый эффект ионора при радиационно-индуцируемом окислении SH-групп.

Вместе с тем в реакциях с продуктами радиолитического распада воды могут участвовать остатки аминокислот мембранных белков, экспонированные в водную фазу. Считается, что существенная роль в окислении SH-групп принадлежит радикалам  $\text{OH}\cdot$  [19]. Последние отщепляют от тиолов атом водорода [21]:



Образовавшийся радикал может реагировать с анионной формой тиола:



Добавление к суспензии плазматических мембран перед облучением этанола вызывает снижение содержания SH-групп при дозе  $10^4$  Гр на 72 % относительно необлученного контроля.

Из рис. 1 видно, что ионор, являющийся «перехватчиком» радикалов в липидной фазе мембраны, при дозе  $10^4$  Гр снижает интенсивность перекисного окисления липидов на 74 %. В то же время введение в суспензию мембран перед облучением этанола, служащего «перехватчиком» радикалов  $\text{OH}\cdot$  в воде, приводит к снижению перекисного окисления липидов на 46 %. Это позволяет предположить, что активация процессов перекисного окисления липидов в плазматической мембране при воздействии ионизирующего излучения в равной мере определяется как прямым действием радиации на липиды, так и воздействием на липиды мембран радикалов  $\text{OH}\cdot$ . В свою очередь, интенсификация процессов перекисного окисления в липидной фазе мембран приводит к окислению SH-групп мембранных белков.

*В. І. Древаль*

Вплив радіації на перекисне окислення ліпідів та окислення SH-груп мембранних білків

Резюме

*Суспензію плазматичних мембран тимоцитів опромінювали у дозах  $5-10^4$  Гр. Визначали перекисне окислення ліпідів, вміст SH-груп у мембранних білках та вплив на ці процеси цистаміна, іонора і етанолу. Отримані дані дозволяють припустити, що радіаційно-індукована ліпопероксидація обумовлена як прямою дією радіації на ліпиди, так і взаємодією ліпідів з продуктами радіолізу води радикалами  $\text{OH}\cdot$ . Окислення SH-груп у білках залежить від процесів перекисного окислення мембранних ліпідів.*

*V. I. Dreval'*

Effect of radiation on lipid peroxidation and oxidies of SH-groups membrane proteins

Summary

*Plasma membrane thymocytes were irradiated with doses of  $5-10^4$  Gy. Lipid peroxidation quantity SH-groups in membrane proteins and effects on these processes, by cystamine, ionol and ethanol were deter-*

*mined. The results give reason to propose, that motive of lipid peroxidation cause direct influence radiation and interaction lipids with OH•-radicals. Oxidies SH-groups in proteins may be cause of process peroxidation by membrane lipids.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудряшов Ю. В., Беренфельд Б. С. Основы радиационной биофизики.—М.: Изд-во МГУ, 1982.—304 с.
2. Singer S., Nicolson G. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // Science.—1972.—175, N 402.—P. 720—731.
3. Древаль В. И., Назаренко Н. Д. Связывание ионов кальция с плазматическими мембранами тимоцитов // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки.—1991.—№ 1.—С. 27—31.
4. Lowry O., Rosebrough W., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193, N 1.—P. 265—279.
5. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.—М.: Наука, 1972.—252 с.
6. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии.—М.: Высш. шк., 1971.—352 с.
7. Закс Л. Статистическое оценивание.—М.: Статистика, 1976.—598 с.
8. Поливода Б. И., Конев В. В., Попов Г. А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.—М.: Энергоатомиздат, 1990.—160 с.
9. Wills E. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues // Biochem. J.—1966.—99, N 6.—P. 667—669.
10. Молчалина А. С. Первичные радиобиологические процессы.—М., 1973.—240 с.
11. Kohn H. Sulfhydryle a new factor in frost resistance. Direct measurements on protein and the nature of the change in SH during vernalization of wheat // Protoplasma.—1963.—57, N 4.—P.556—562.
12. Владимиров В. Г., Красильников И. И., Арапов О. В. Радиопротекторы: структура и функции.— Киев: Наук. думка, 1989.—264 с.
13. Чеботарев Е. Е., Барабой В. А., Дружина Н. А. и др. Окислительные процессы при гамма-нейтронном облучении организма.— Киев: Наук. думка, 1986.—216 с.
14. Фоменко Б. С., Акоев И. Г. Радиационное повреждение плазматической мембраны и летальное действие радиации на клетки // Успехи соврем. биологии.—1984.—97, № 1.—С. 146—158.
15. Окада Ш. Радиационная биохимия клетки.— М.: Мир, 1974.—407 с.
16. Эмануэль Н. М., Лясковский Ю.Н. Торможение процессов окисления жиров.—М.: Пищепром, 1961.—359 с.
17. Древаль В. И., Финашин А. В. Влияние перекисного окисления липидов плазматических мембран на активность Са<sup>2+</sup>-АТФазы // Укр. биохим. журн.—1991.—36, № 5.—С. 799—801.
18. Граевский Э. Я. Сульфгидрильные группы и радиочувствительность.—М.: Атомиздат, 1969.—144 с.
19. Штреффер К. Радиационная биохимия.—М.: Атомиздат, 1972.—200 с.
20. Тимофеев-Ресовский Н. В., Савич А. В., Щальнов М. И. Введение в молекулярную радиобиологию.—М.: Медицина, 1981.—320 с.
21. Свеллоу А. Д. Радиационная химия органических соединений.—М.: Иностран. лит., 1963.—203 с.