

лотный состав С-концевого аргининсодержащего триптического пептида из фрагмента Тm2 вычисляется как разница между аминокислотным составом фрагмента и суммой составов пептидов Т3, Т4, Т35 и Т57.

Сравнивая выходы субфрагментов из пептида Тm2 (см. табл. 2), можно предположить, что при частичном гидролизе модифицированных по остаткам лизина пептидов предложенным методом расщепление идет преимущественно по остаткам малеил-лизина. Однако не полностью разрушаются связи Lys-Val и Lys-Pro. Мы полагаем, что остатки лизина, образующие эти связи, не до конца промалеилированы, что подтверждается расщеплением трипсином малеил-каталазы по некоторым остаткам лизина (см. пептиды Тm3, Тm5, Тm9 и др. в табл. 1). Гидролиз пептида Тm2 идет также по остаткам аспарагиновой кислоты и в незначительной степени — по остаткам других аминокислот.

Приведенные в табл. 2 46 пептидов насчитывают 686 остатков аминокислот. Аминокислотные последовательности 19 пептидов (подчеркнуты в табл. 1) перекрываются с таковыми других пептидов. 36 пептидов с уникальными аминокислотными последовательностями содержат 561 остаток, что составляет 81 % полипептидной цепи каталазы.

Summary. Partial or complete amino acid sequence of 46 tryptic peptides from maleyl-catalase was determined. 36 unique peptides comprise 561 amino acid residues and account for 81 % of the catalase polypeptide chain.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левитина Т. Л., Мирошниченко О. С., Гудкова Л. В. и др. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Выделение и аминокислотный состав // Биополимеры и клетка. — 1993. — 9, № 1. — С. 5—8.
2. Гусак Н. М., Овндер М. Н., Дробот Л. Б., Серебряный С. Б. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил-Эдман // Методы молекулярной биологии. — Киев: Наук. думка, 1979. — С. 142—153.
3. Гусак Н. М., Левитина Т. Л., Атепалахина С. А. и др. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 3. Строение некоторых пептидов // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 1. — С. 45—51.
4. Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Родина Н. В. и др. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Там же. — № 5. — С. 55—63.
5. Алахов Ю. Б., Бундулис М. А., Бундулис Ю. П. Первичная структура фактора элонгации G из *E. coli*. IV. Структура пептидов бромцианового расщепления молекулы G-фактора // Биоорг. химия. — 1983. — 9, № 3. — С. 304—314.
6. Козлов Э. А., Гудкова Л. В., Левитина Т. Л. и др. Дополнительное исследование триптических пептидов каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка. — 1993. — 9, № 1. — С. 22—25.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 24.07.92

УДК 577.391

В. И. Древаль

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА БЕЛОК- ЛИПИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЛИПОСОМ

Изучили влияние ионизирующего излучения в дозах 10—10⁴ Гр на комплексы липосом с метгемоглобином и феррицитохромом С. Установлено снижение полосы Core и увеличение пероксидации липидов. Для комплексов липосом с метгемоглобином рассчитаны константы связывания, число мест связывания и А G.

Введение. К настоящему времени установлена важная роль мембран клетки в реализации поражающего действия радиации на организм [1, 2]. Изменения белкового [3] и липидного [4] компонентов биоло-

© В. И. Древаль, 1993

гических мембран сопровождаются нарушениями структурной организации мембран [5]. В работе [6] это объясняется процессами кооперативных переходов белок-липидного матрикса мембран в результате изменения белок-липидных взаимодействий. Ранее были получены данные о характере взаимодействия метгемоглобина и феррицитохрома С с липидами в липосомах [7, 8]. Особенности радиационного поведения [9, 10] и биологических функций гемопротесидов [11, 12] дают основание предположить, что при облучении они могут оказывать определенное влияние на формирование радиационных повреждений в белок-ли-

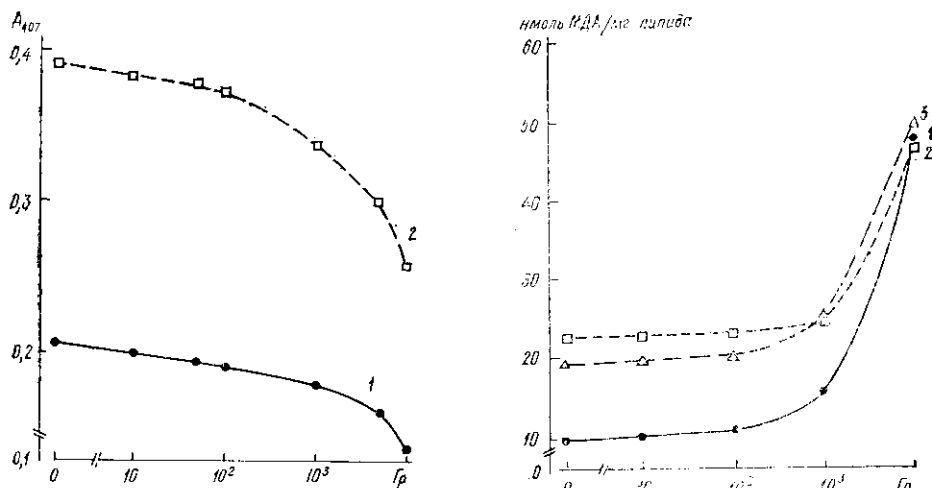


Рис. 1. Изменение интенсивности полосы Сорета для метгемоглобина (1) и феррицитохрома С (2) при облучении липосом

Рис. 2. Накопление МДА при облучении липосом (1) в комплексе с метгемоглобином (2) и феррицитохромом С (3). По вертикали - нмоль МДА/мг липида

пидном комплексе мембран. В связи с этим в настоящем сообщении исследовали влияние ионизирующей радиации на белок-липидные комплексы метгемоглобина и феррицитохрома С с липосомами.

Материалы и методы. Суммарные фосфолипиды выделяли из желтков куриного яйца по методу [13]. Везикулярные мембраны готовили обработкой фосфолипидной суспензии ультразвуком, как описано ранее [7].

Метгемоглобин получали, окисляя 1,2 М феррицианидом калия оксигемоглобин, выделенный из крови человека [14], с последующей гель-фильтрацией на молселекте G-25.

Для связывания метгемоглобина и феррицитохрома С («Реакхим») с липосомами использовали буфер (0,01 М трис-HCl, pH 7,4), содержащий 0,15 М NaCl (25 °С, 90 мин). Концентрация липида в пробе 8 мг/мл. Мольное отношение липид : белок варьировали от 2 : 1 до 1 : 10. Липосомы с адсорбированным метгемоглобином отделяли от свободного метгемоглобина гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-200 (1×20 см, скорость фильтрации 5 мл/ч). Для определения количества связанного с липосомами метгемоглобина везикулы предварительно солибилизировали 0,1 %-м DS-Na. Концентрацию белка регистрировали по методу Лоури и соавт. [15] на СФ-46 при 750 нм.

Концентрацию продуктов перекисного окисления липидов находили по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при длине волны 535 нм ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [16] и выражали в концентрации малонового диальдегида (МДА) на 1 мг мембранного липида.

Обработку экспериментальных данных с использованием *t*-критерия Стьюдента и расчеты коэффициента корреляции (*r*) [17] осуществляли на ЭВМ «Искра-1030».

Облучение проводили на линейном ускорителе электронов энергией 5 МэВ в дозах 10, 50, 10^2 , 10^3 , $5 \cdot 10^3$ и 10^4 Гр.

Результаты и обсуждение. Степень радиационно-химических изменений связанных с липосомами гемсодержащих белков метгемоглобина и феррицитохрома С определяли по интенсивности оптической плотности в области полосы Сорс (407 нм). Можно видеть (рис. 1), что воздействие ионизирующего излучения приводит к снижению интенсивности полосы Сорс. Это согласуется с полученными ранее данными [18, 19]. По уровню содержания МДА в липосомах (рис. 2) можно судить о возрастании процессов перекисного окисления липидов с увеличением дозы ионизирующего излучения. Расчеты коэффициента корреляции величины интенсивности полосы Сорс для метгемоглобина и феррицитохрома С и содержания МДА в липосомах ($r = -0,944$ и $-0,980$ соответственно) указывают на взаимообусловленность этих процессов. Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что воздействие ионизирующего излучения на белок-липидные комплексы липосом вызывает изменение структуры белков и нарастание перекисидации липидов.

Для анализа влияния радиации на процессы взаимодействия белков и липидов в мембране липосомы и метгемоглобин облучали в дозе 10^3 Гр, после чего изучали их связывание. Исследованы следующие комбинации: необлученный метгемоглобин + необлученные липосомы; облученный метгемоглобин + необлученные липосомы; необлученный метгемоглобин + облученные липосомы; облученный метгемоглобин + облученные липосомы. Константу связывания (K_a) и число мест связывания (N) рассчитывали по методу наименьших квадратов в координатах уравнения Скотчарда: $R/C = K_a \cdot N - K_a \cdot R$, где R — мольное соотношение метгемоглобина и фосфолипидов в белок-липидном комплексе; C — концентрация белка [20]. Изменение свободной энергии определяли по формуле $\Delta G = -RT \ln K_a$. Полученные результаты приведены в таблице. Можно отметить, что связывание облученного метгемоглобина с суспензией необлученных липосом приводит к возрастанию числа мест связывания на 24 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (необлученный метгемоглобин + необлученные липосомы), константа связывания при этом достоверно не изменяется. Связывание необлученного метгемоглобина с облученными липосомами вызывает снижение K_a в 2,6 раза ($p < 0,01$), а N увеличивается в 1,8 раза ($p < 0,01$). Связывание облученного метгемоглобина с облученными липосомами приводит к снижению числа мест связывания на 10 % ($p > 0,05$), тогда как K_a возрастает на 32 % ($p < 0,05$).

Полагают, что радиационное поражение гемоглобина в растворе сопровождается конформационными перестройками в его структурной организации под влиянием прямого действия радиации [10]. Ранее установлено [8], что взаимодействие метгемоглобина с фосфолипидными везикулами определяется изменениями в структуре липидного билayers. Известно, что появление в жирнокислотных цепях гидроксильных группировок приводит к нарушению комплексообразования липида с белком [21]. Очевидно, наблюдаемые при воздействии ионизирующей радиации активация процессов перекисного окисления липидов в липосомах и модификация структуры метгемоглобина вызывают измене-

Параметры связывания метгемоглобина с липосомами

Компонент комплекса	$K_a \cdot 10^2, M^{-1}$	$N \cdot 10^{-2}$	$\Delta G, \text{ кДж/моль}$
Метгемоглобин необлученный + липосомы необлученные	$7,04 \pm 0,49$	$0,68 \pm 0,05$	-16,25
Метгемоглобин облученный + липосомы необлученные	$6,20 \pm 0,37$	$0,84 \pm 0,08$	-15,93
Метгемоглобин необлученный + липосомы облученные	$2,75 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,16$	-13,92
Метгемоглобин облученный + липосомы облученные	$9,29 \pm 0,78$	$0,61 \pm 0,04$	-16,94

ние белок-липидных взаимодействий, обусловленных структурным соответствием белков и липидов в мембране [22]. Результаты изучения связывания липосом и метгемоглобина позволяют предположить, что нестабильность белок-липидных взаимодействий при воздействии ионизирующего излучения на мембраны в значительной мере зависит от липидного компонента.

Summary. The effect of ionization radiation in doses $10-10^4$ Gr on complexes liposomes with methemoglobin and ferricytochrome C has been investigated. It was shown decrease stripe Sore and increase lipid peroxidation. For complexes liposomes with methemoglobin constants of binding, number places of binding and ΔG was calculated.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Полывода Б. И., Конев В. В., Попов Г. А.* Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.— М.: Энергоатомиздат, 1990.— 460 с.
2. *Кудряшов Ю. Б., Беренфельд Б. С.* Основы радиационной биофизики.— М.: Изд-во МГУ, 1982.— 304 с.
3. *Рыскулова С. Т.* Радиационная биология плазматических мембран.— М.: Наука, 1989.— 120 с.
4. *Колодийцева И. К.* Радиационная биология мембранных липидов.— М.: Наука, 1989.— 120 с.
5. *Фоменко Б. С., Акоев И. Г.* Структурные изменения плазматических мембран под действием ионизирующей радиации // *Успехи соврем. биологии.*— 1982.— **93**, № 2.— С. 183—193.
6. *Benga G., Holmest R.* Interactions between components in biological membranes and implications for membrane function // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*— 1984.— **43**— Р. 195—255.
7. *Горбенко Г. П., Древаль В. И.* Взаимодействие метгемоглобина с фосфолипидными везикулами // *Биополимеры и клетка.*— 1990.— **6**, № 2.— С. 87—90.
8. *Древаль В. И., Горбенко Г. П.* Влияние метгемоглобина и феррицитохрома С на структуру липидного бислоя // *Укр. биохим. журн.*— 1990.— **62**, № 5.— С. 111—114.
9. *Амирагова М. И.* Радиационное окисление цитохрома С в водных растворах // *Радиобиология.*— 1972.— **12**, № 4.— С. 578—582.
10. *Стародуб Н. Ф., Рекун Г. М., Шурьян И. М.* Радиационное поражение гемоглобина.— Киев: Наук. думка, 1976.— 129 с.
11. *Коржнев П. А.* Гемоглобин.— М.: Наука, 1964.— 146 с.
12. *Скулачев В. П.* Энергетика биологических мембран.— М.: Наука, 1989.— 564 с.
13. *Dawson R. W.* On the mechanism of action of phosphokinase // *Biochem. J.*— 1963.— **88**, N 3.— Р. 414—423.
14. *Розенберг Г. Я., Вязова Е. П., Иванова Г. Н. и др.* Получение очищенного препарата гемоглобина и изучение его свойств // *Пробл. гематологии и переливания крови.*— 1975.— **20**, № 11.— Р. 25—29.
15. *Lowry O., Rosebrough W., Farr A., Randall R.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*— 1951.— **193**, N 1.— Р. 265—279.
16. *Владимирова Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.— 252 с.
17. *Закс Л.* Статистическое оценивание.— М.: Статистика, 1976.— 598 с.
18. *Амирагова М. И.* Структура, функции и радиолит гемопротендов // *Радиационное поражение и восстановление структур и функций макромолекул.*— М.: Медицина, 1977.— С. 80—120.
19. *Lynn K. R., Raoult A. P.* The effect of gamma-irradiation on solutions of catalase, аrocatalase // *Int. J. Radiat. Biol.*— 1973.— **24**— Р. 25—31.
20. *Селищева А. А., Образцов В. В., Козлов Ю. П.* О различном характере взаимодействия окисленного и восстановленного цитохрома С с фосфолипидными везикулами // *Биохимия.*— 1978.— **43**, № 11.— С. 2047—2054.
21. *Мазо В. К., Ситковский М. В., Янющин М. Ф.* Изучение взаимодействия белков с окисленными жирными кислотами // *Биоантиокислители.*— М.: Наука, 1975.— С. 212—216.
22. *Singer S., Nicolson G.* The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science.*— 1974.— **175**, N 4023.— Р. 720—731.

Харьков, гос. ун-т.

Получено 19.06.92