6. *Duggan D. E.* Arch. Biochem. Biophys., *84*, 116, 1959.
7. *Green J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., *203*, 23, 1972.
8. *Limber G. K., R. Davis Bakerman S.* Blood, *36*, 111, 1970.
9. *Lowry O. H., Rosenbrough N. S., Faur A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.
10. *Tappel A. L.* Ann. N. Y. Acad. Sci., *203*, 12—27, 1972.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 577.343

ФОТОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ СВЕТОМ

М. Л. ГЕВОРКЯН, А. Е. ЗАКАРЯН

Обнаружено существенное возрастание интенсивности фотохемилюминесценции растворов аргиназы и сывороточного альбумина человека при облучении ультрафиолетовым светом в течение 2—3 часов. Предполагается, что облучение ультрафиолетовым светом приводит к нарушению нативной конформации белков, в результате чего в фотохимические процессы вовлекаются ранее недоступные участки макромолекулы белка, что и приводит к возрастанию интенсивности фотохемилюминесценции.

Ключевые слова: фотохемилюминесценция растворов белков, конформация белков.

Фотохемилюминесценция (ФХЛ) растворов белков, возникающая при облучении ультрафиолетовым светом, исследовалась в ряде работ [3—6]. Показана свободнорадикальная природа этого явления и участие кислорода в процессах ФХЛ. Установлены в общих чертах механизм процессов, приводящих к ФХЛ, и важная роль в них остатков триптофана [5, 6]. Исследование процессов ФХЛ позволяет получить ценные сведения о фотохимии белков, свободнорадикальных превращениях в растворе, а также о конформационных изменениях белковых молекул [3, 6]. Большинство работ, однако, посвящено исследованию процессов, происходящих на начальных этапах облучения ультрафиолетовым светом. В данной работе приводятся результаты изучения закономерностей ФХЛ растворов аргиназы и сывороточного альбумина человека (САЧ) при длительном облучении. Такое исследование поможет лучше понять процессы, происходящие в растворах белков при облучении, внесет вклад в изучение механизма нарушения конформации и инактивации ферментов под действием ультрафиолетового света.

Материал и методика. В работе использовались препараты аргиназы печени крупного рогатого скота, сывороточного альбумина человека, N-ацетил-d, l-триптофана, глицина (Реанал, Венгрия), уреазы (отечественного производства). Растворы белков готовили на 0,05 М глициновом (pH 9,5) и 0,01 М фосфатном (pH 7) буферах в концентрации 10^{-5} М. Исследуемые растворы (5 мл) облучали в открытой термостатированной (25°) кювете при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Облучение проводили полным светом ртутной лампы ПРК-4 с помощью об-

ОКУФ-5 м на расстоянии 4,5 см от основания кюветы. Интенсивность ФХЛ измеряли на установке для регистрации хемилюминесценции, описанной ранее [1]. В облученных растворах аргиназы определяли активность фермента по методу Ратнер с небольшими изменениями, как описано ранее [1]. Тепловую денатурацию растворов белков проводили путем их нагревания на водяной бане в течение 5—10 мин при 70° или 80°. Затем растворы охлаждали до комнатной температуры и исследовали обычным способом.

При исследовании влияния ионов Mn^{2+} на интенсивность ФХЛ растворов белков перед облучением к ним добавляли раствор $MnCl_2$ в концентрации 25 мМ (0,5 мл). Присутствие этих ионов в растворе не влияло на кинетику послесвечения белков в данных условиях.

Результаты и обсуждение. ФХЛ растворов аргиназы исследовалась нами и ранее [1, 2]. Основные характеристики ее сходны с таковыми растворов других белков [6]. Типичная кинетическая кривая ФХЛ растворов аргиназы, как было показано в работе [1], состоит из двух составляющих: на начальном этапе скорость снижения интенсивности ФХЛ несколько выше, чем на более поздней стадии затухания свечения. В данной работе исследовалась зависимость относительной начальной интенсивности ФХЛ— I^0 от времени облучения. Эта величина определялась экстраполяцией начального участка полулогарифмической анаморфозы кинетической кривой к нулевому моменту [1]. На рис.

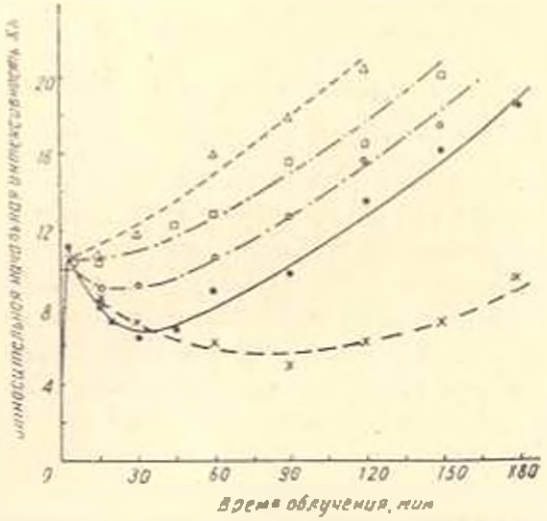

Рис. 1. Зависимость относительной начальной интенсивности ФХЛ растворов аргиназы от времени облучения (○) и влияние на нее ионов Mn^{2+} (×), предварительной тепловой обработки при 70° (10 мин) (○), 80°, (10 мин) (□), а также предварительного облучения ультрафиолетовым светом (1 час) (Δ).

1 видно, что относительная начальная интенсивность ФХЛ возрастает в первые 2—5 мин, достигает максимума, затем медленно снижается, что наблюдалось и ранее [1, 2]. Однако при увеличении времени облучения до 2—3 ч наблюдается повторное увеличение интенсивности ФХЛ, превышающее начальное повышение I^0 почти в 2 раза. По тангенсу угла наклона двух составляющих полулогарифмической анаморфозы кинетической кривой были определены значения величины констант скоростей снижения интенсивности ФХЛ—k_1 и k_2, характеризующие

форму кинетической кривой. Из рис. 2 а видно, что значения k_1 с увеличением времени облучения не меняются, тогда как значения k_2 уменьшаются. Это свидетельствует об изменении кинетики ФХЛ и наличии конформационных изменений молекулы белка при длительном облучении [3].

Полученные данные позволили предположить, что повторное возрастание интенсивности ФХЛ связано с нарушением конформации аргиназы в ходе облучения, благодаря чему активные продукты фотолиза триптофанилов взаимодействуют с ранее недоступными участками макромолекулы, образуя свободные радикалы, участвующие в процессах ФХЛ. В связи с этим представляло интерес исследовать влияние факторов, поддерживающих нативную конформацию молекулы белка, на интенсивность ФХЛ. Как известно, ионы Mn^{2+} оказывают стабилизирующее влияние на молекулу аргиназы [7, 8]. Эксперименты, проведенные с растворами аргиназы в присутствии этих ионов, показали, что добавление ионов Mn^{2+} в концентрации 2,5 мМ влияет на ход кривой зависимости начальной интенсивности ФХЛ от времени облучения (рис. 1), не отражаясь на кинетике послесвечения. Вторичное повышение начальной интенсивности ФХЛ в этом случае происходит только после 2,5—3 ч облучения, тогда как без ионов Mn^{2+} возрастание I^0 наблюдается уже через 45—60 мин после начала облучения.

Измерение интенсивности ФХЛ было проведено также в растворах аргиназы, подвергнутых предварительной тепловой обработке в течение 10 мин при температуре 70° и 80° (рис. 1). Эти эксперименты показали, что вторичное повышение начальной интенсивности ФХЛ в растворах белка после тепловой обработки происходит уже через 15—20 мин после начала облучения, а через 2 часа I^0 возрастает почти в 2 раза (рис. 1). Значения k_1 и k_2, характеризующие форму кинетической кривой ФХЛ в этих растворах, в результате облучения уменьшаются (рис. 2 б), т. е. кинетика процессов ФХЛ существенно изменяет-

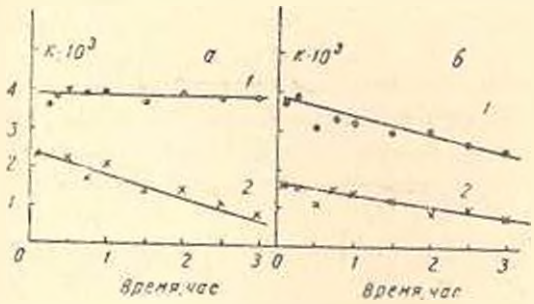

Рис. 2. Влияние длительности облучения на величины констант скоростей снижения интенсивности ФХЛ — k_1 и k_2 для растворов нативной (а) и подвергнутой тепловой обработке (80°, 10 мин) аргиназы (б).

ся. Значение k_2 для раствора аргиназы, подвергнутого тепловой обработке, при облучении в течение 5 мин составляет $1{,}4 \cdot 10^{-3}$ сек$^{-1}$. Это ниже соответствующего значения константы для растворов нативной аргиназы и совпадает со значением k_2 для облученного в течение 90 мин раствора фермента, что указывает на сходство процессов ФХЛ в этих

случаях (рис. 2). Интенсивность ФХЛ раствора аргиназы, предварительно облученного ультрафиолетовым светом в течение часа в тех же условиях (рис. 1), возрастает сразу, минуя стадию снижения на начальном участке кривой. Все эти данные указывают на связь повторного возрастания интенсивности ФХЛ при длительном облучении ультрафиолетовым светом с процессами нарушения нативной конформации белка.

Параллельно с измерением интенсивности ФХЛ было проведено определение аргиназной активности в облученных растворах фермента. В ходе облучения активность аргиназы постепенно снижается (рис. 3) и через 3 ч составляет 20% от исходной. Присутствие ионов Mn^{2+} частично снижает степень инактивации аргиназы в данных условиях, причем защитный эффект лучше выражен при длительном облучении. Очевидно, стабилизация нативной конформации молекулы аргиназы в присутствии ионов марганца отражается на скорости инактивации фермента и на процессах ФХЛ растворов аргиназы в данных условиях.

Аналогичные эксперименты были проведены на растворах САЧ (рис. 4). Как видно из рисунка, в этом случае наблюдаются те же за-

Рис. 3.

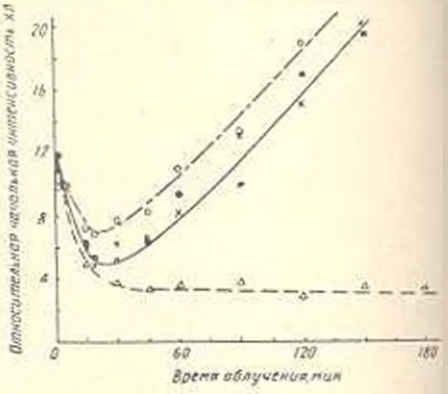

Рис. 4.

Рис. 3. Инактивация растворов аргиназы (●) в ходе облучения и влияние ионов Mn^{2+} (x) на этот процесс.

Рис. 4. Зависимость относительной начальной интенсивности ФХЛ растворов САЧ (pH 7) (●) и ацетил-триптофана ($5 \cdot 10^{-3}$М, pH 9,5) (△) от времени облучения. Влияние ионов Mn^{2+} (x) и предварительной тепловой обработки (80°, 5 мин), (○).

кономерности. После 2,5 ч облучения I^0 увеличивается в 2 раза по сравнению с ее начальным увеличением. Ионы Mn^{2+}, однако, не влияют на интенсивность ФХЛ растворов САЧ при длительном облучении, что свидетельствует о специфичности их воздействия на аргиназу (рис. 4). Предварительная тепловая обработка растворов САЧ (80°, 5 мин) приводит к повышению уровня интенсивности ФХЛ уже через 20 мин после начала облучения. Можно было предположить, что повышение интенсивности ФХЛ связано с накоплением фотопродуктов, образующихся в результате фотолиза триптофанилов в растворе белка. Для выяснения этого вопроса была исследована ФХЛ растворов ацетил-триптофана

при облучении ультрафиолетовым светом в тех же условиях (рис. 4). Однако в этом случае с увеличением времени облучения до 3 ч не наблюдается повторного возрастания начальной интенсивности ФХЛ, т. е. накопление продуктов фотолиза триптофана в растворе не влияет на интенсивность ФХЛ в данных условиях.

Таким образом, обнаруженное нами повторное увеличение интенсивности ФХЛ растворов исследуемых белков при длительном облучении, по-видимому, связано с нарушением нативной конформации их и вовлечением ранее недоступных участков макромолекул в процессы фотохимических превращений, происходящих при облучении ультрафиолетовым светом.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики Поступила 24.II 1981 г.

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԼՈՒԾՈՒՅԹՆԵՐԻ ՖՈՏՈՔԵՄԻԼՅՈՒՄԻՆԵՍՑԵՆՑԻԱՆ ՈՒԼՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ ԼՈՒՅՍՈՎ ԵՐԿԱՐԱՏԵՎ ՃԱՌԱԳԱՅԹՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Մ. Լ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ե. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

Հայտնաբերված է խոշոր եղջյուրավոր անասունների լյարդի արգինազայի և մարդու շիճուկային ալբումինի լուծույթների ֆոտոքեմիլյումինեսցենցիայի (ՖՔԼ) ինտենսիվության բարձրացում ուլտրամանուշակագույն լույսի երկարատև (3 ժամ) ազդեցության դեպքում։ Ցույց է տրված Mn^{+} իոնների արգելակող և ջերմային դենատուրացիայի խթանող ազդեցությունները ՖՔԼ-ի ինտենսիվության վրա։ Ենթադրվում է, որ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթման ժամանակ տեղի է ունենում սպիտակուցների կոնֆորմացիայի խախտում։ Ֆոտոքիմիական պրոցեսների մեջ ընդգրկվում են սպիտակուցային մոլեկուլի նոր հատվածներ, որոնց փոխազդեցությունը ճառագայթման ժամանակ առաջացող ակտիվ մասնիկների հետ հանգեցնում է ՖՔԼ-ի ինտենսիվության բարձրացման։

PHOTOCHEMILUMINESCENCE OF THE PROTEINS SOLUTIONS DURING PROLONGED IRRADIATION BY ULTRAVIOLET LIGHT

M. L. GEVORKIAN, A. E. ZAKARIAN

The essential growth of the intensity of photochemiluminescence of arginase and human serum albumin solutions is observed under the ultraviolet irradiation during 2—3 hours. Under the ultraviolet prolonged irradiation the disturbance of native conformation of proteins takes place. New sites of molecule are included into the photochemical processes and owing to this the increase of intensity of photochemiluminescence takes place.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Даитян М. А.* Биолог. ж. Армении, 27, 9, 44—49, 1974.

2. *Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Демин Ю. М.* Уч. зап. ЕГУ, *1*, 78—83, 1976.
3. *Нисенбаум Г. Д., Аксенцев С. Л., Конев С. В.* Биофизика, *14*, 3, 402—406, 1969.
4. *Сапежинский И. И.* ДАН СССР, *175*, 1167, 1967.
5. *Сапежинский И. И.* Химия высоких энергий, *3*, 325—328, 1969.
6. *Сапежинский И. И.* В сб.: Молекулярная радиобиология. М., 95—129, 1972.
7. *Greenberg D. M., Bagot A. E., Roholt O. A.* Arch. Biochem. Biophys., *62*, 2, 446—453, 1956.
8. *Hirsch—Kolb H., Heine J. P., Kolb H. J., Greenberg D. M.* Comp. Biochem. Physiol., *37*, 3, 315—359, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 615.84:576.311

СОДЕРЖАНИЕ Ca^{++} В МИТОХОНДРИЯХ И УРОВЕНЬ АТФ В ПЕЧЕНИ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Г. Г. АРЦРУНИ, А. С. ТЕР-МАРКОСЯН

Исследовалось содержание Ca^{++} в митохондриях печени и АТФ в печеночной ткани крысы после воздействия электростатического поля напряженностью 2000 в/см и длительностью 1 час, сутки и 6 суток по 6 часов ежедневно. Установлено уменьшение Ca^{++} в митохондриях и АТФ печени в этих условиях. Максимальные сдвиги в изученных параметрах наблюдаются после одночасового воздействия.

Ключевые слова: электростатическое поле, митохондрии, Ca^{++}, АТФ.

Ранее нами было показано, что воздействие электростатического поля (ЭСП) приводит к определенным структурным [1] и функциональным перестройкам митохондрий печени крыс, нарушению процесса окислительного фосфорилирования [5]. Для оценки функционального состояния митохондрий, наряду с процессом окислительного фосфорилирования, представляется интересным изучение и другой весьма важной функции этих органелл—способности активно накапливать ионы Ca^{++}.

В настоящей работе приводятся данные о влиянии ЭСП на содержание Ca^{++} в митохондриях печени и уровень АТФ в печеночной ткани крыс.

Материал и методика. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах самцах массой 150—180 г. Животных подвергали воздействию ЭСП напряженностью 2000 в/см, продолжительностью 1 час, сутки и 6 суток по 6 часов ежедневно. ЭСП создавали при помощи установки конденсаторного типа [2]. Опыты ставили сразу после воздействий, во избежание влияния циркадных ритмов экспериментальных и контрольных животных забивали в одно и то же время суток. Митохондрии из печени животных выделяли по методу Мосоловой с соавт. [4]. Степень чистоты фракции и целостности митохондрий контролировали электронномикроскопически.

Содержание ионов Ca^{++} в митохондриях определяли при помощи флуоресцентного зонда, в качестве которого использовали хлортетрациклин, обладающий большим сродством к внутримитохондриальному Ca^{++}. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции комплекса Ca^{++}—хлортетрациклин [8]. Подробное описание методики приведено в нашей предыдущей работе [6]. Измерения проводили на спек-