

БИОФИЗИКА

С. С. Оганесян и Т. С. Заминан

Разделение водорастворимых белков миокарда методом электрофореза на бумаге в норме и после ионизирующего облучения

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 20/II 1962)

В настоящее время известно, что массивное ионизирующее облучение животного способно не только угнетать, но и стимулировать синтез отдельных белков сыворотки крови (¹⁻³). Подобное явление, вероятно, обуславливается различной резистентностью к облучению органов и систем животного организма, ответственных за синтез тех или иных белковых молекул (⁴). В связи с отсутствием данных о влиянии ионизирующего облучения на синтез мышечных белков в настоящей работе была поставлена задача выявить количественные сдвиги в составе водорастворимых белков миокарда белых крыс, подвергшихся облучению рентгеновскими лучами. С этой целью был применен метод электрофоретического разделения водорастворимых белков мышц на бумаге (⁵).

Опыты проводились на двух группах животных, интактных и облученных (однократное общее облучение дозой 500 р/час). Каждая группа состояла из 10 крыс. Облучение производилось аппаратом РУМ-3. В течение первых 3—5 дней у животных развивалась типичная картина лучевой болезни, некоторые из них погибли на 10—12 день, поэтому опыты проводились через 9—10 дней после облучения.

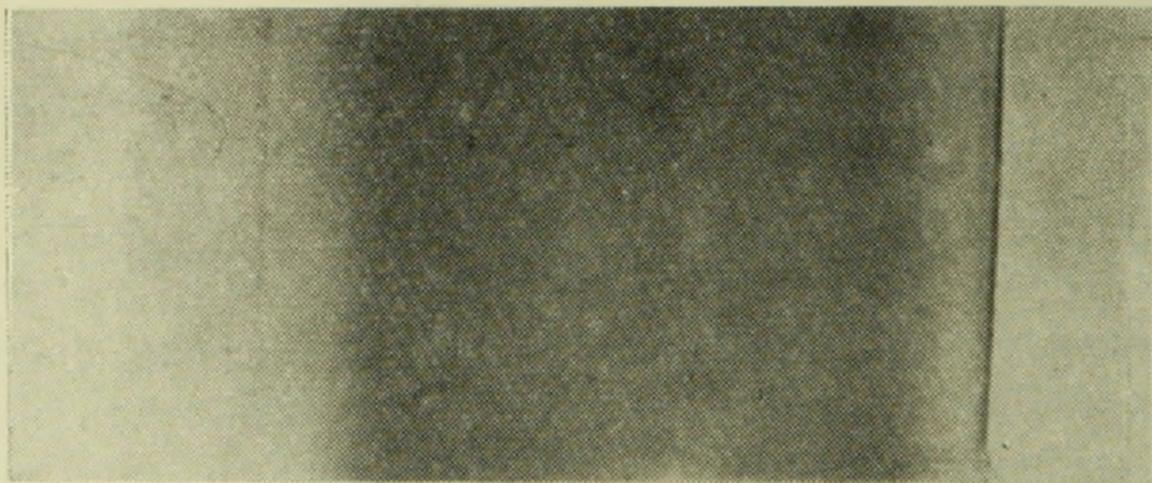
Крысы убивались декапитацией, после чего производилась перфузия тела животного холодным физиологическим раствором для удаления остатков крови. Производилась также вторичная перфузия сердца.

Сердце вырезывалось, размельчалось и гомогенизировалось с песком. Водорастворимые белки миокарда экстрагировались в течение 90 минут при постоянном смешивании фосфатным буфером ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{—NaH}_2\text{PO}_4$, $\mu = 0,1$, $\text{pH} = 7,5$). Полученный экстракт центрифугировался в течение 30 минут при $12000 \times g$. Надосадочная жидкость, содержащая водорастворимые белки, декантировалась и сохранялась на холоде. Содержание белка в ней составляло 1,7—2,5%. Все процедуры, связанные с выделением белков, проводились в холодной комнате при $+2^\circ\text{C}$.

Для электрофоретического разделения водорастворимых белков были использованы аппараты ЭФА-1 и MGF. Электрофорез проводился на оте-

чественной бумаге — хроматографическая «Б» в фосфатном буфере ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$, $\mu = 0,1$, $\text{pH} = 7,5$) при $5-12 \text{ v/cm}$ в течение $19-21$ часов, при $+2-+4^\circ\text{C}$. Полученные электрофореграммы оценивались фотометрированием с помощью денситометра MGF, расчет площадей производился планиметром.

У интактных животных нам удалось получить достаточно четкое разделение фракций водорастворимых белков на $5-6$ фракций, причем в отличие от электрофореграмм, полученных при применении белкового экстракта поперечно-полосатых мышц, наблюдалось более отчетливое разделение на подфракции самой медленной миогеновой фракции (фиг. 1).



Фиг. 1. Электрофореграмма водорастворимых белков миокарда крыс. Фосфатный буфер ($\text{pH} = 7,5$), 19 часов, 7 v/cm .

Согласно данным, полученным при разделении водорастворимых белков сердца классическим методом электрофореза (по Тизелиусу), их электрофореграмма принципиально не отличается от электрофореграмм скелетных мышц и в основном состоит из тех же фракций ($5-7$).

I фракция ($n+m+L$) — миоген Барановского, фосфоглицеральдегиддегидраза, фосфоглюкомутаза, альдолаза.

II фракция (k_1, k_2) — фосфорилаза Кори (I и II)

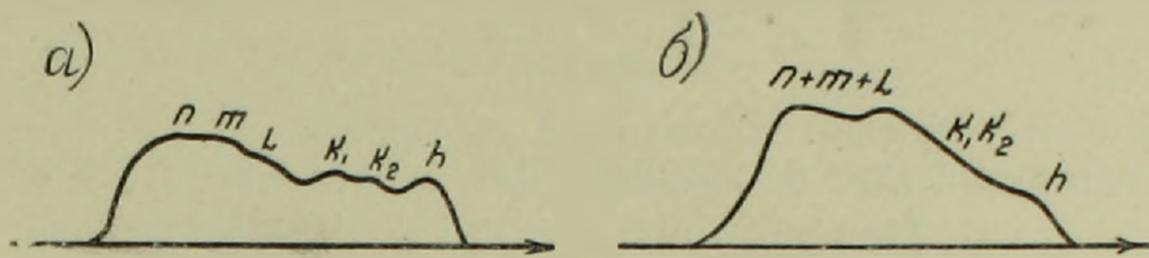
III фракция (h) — миоальбумин.

Однако по количественному содержанию отдельных белковых пиков электрофореграммы сердечной мышцы отличаются от электрофореграмм водорастворимых белков скелетной мускулатуры. Эта разница, наблюдаемая другими авторами ($7,8$), работавшими классическим методом электрофореза, проявлялась и в наших опытах с применением электрофореза на бумаге. В частности, интересен факт содержания большого количества миоальбумина в сердечной мышце, относительный процент которого составлял $13,2 \pm 2,8\%$, когда в скелетной мышце составляет $5,34 \pm 0,82\%$. В наших прежних исследованиях было установлено, что именно относительное количество этого белка увеличивается в скелетных мышцах крысы, атрофированных вследствие денервации (9), то же самое было показано другими авторами ($8,10$). Несколько увеличено также относительное количество фосфорилаз в сердечной мышце — $26,6 \pm 5,47\%$, когда в скелетной мышце оно составляет $21,4 \pm 4,5\%$. За счет увеличения относительного содержания на электрофореграммах пиков миоальбумина и фосфорилаз от-

мечается соответственное уменьшение миогеновой фракции по сравнению со скелетной мускулатурой (фиг. 2а).

Таким образом, бумажный электрофорез оказался достаточно приемлемым для получения данных об относительном количестве различных водорастворимых белков миокарда.

После общего облучения рентгеновскими лучами животных и в процессе развития лучевой болезни мы встретились с некоторыми затрудне-



Фиг. 2. Кривые электрофореграмм водорастворимых белков миокарда белых крыс: а — интактное; б — облученное животное. Фосфатный буфер (рН=7,5), 12 в/см, 20 часов.

ниями при разделении фракций белков на бумаге. Поэтому электрофорез проводился с большим градиентом напряжения — 10—12 в/см. Был установлен значительный сдвиг в относительном количестве отдельных фракций на электрофореграммах (фиг. 2б). Причем эти сдвиги были самого противоположного направления. Как показано в табл. 1, у облученных животных наблюдается значительное увеличение количества фракций *n* и *m* и небольшое уменьшение фракции *L* (альдолаза). Количество фракций фосфорилаз (*k*₁ *k*₂) подвергается отчетливому снижению от 26,6 до 17,5%. Однако в содержании фракции *h* достоверных изменений не обнаруживается. В настоящее время трудно объяснить, почему при облучении нарушается синтез фосфорилаз и стимулируется количественный синтез *n* + *m* фракций, содержащих ферменты, участвующие тоже в окислительном фосфорилировании. Интересен также факт отсутствия изменений в содержании фракции *h*, малодифференцированного белка миоальбумина, не обладающего специфическими ферментативными свойствами и характерного для эмбриональной и денервированной тканей. В этом отношении интересно, что эритробласты (I) в противоположность синтезу иммунных тел (II) обладают более высокой резистентностью к ионизирующему облучению. Однако объяснение данных, полученных методом электрофореза, об отсутствии изменений в количественном синтезе миоальбумина, по-видимому, пока невозможно.

Таблица 1

Фракции	Интактное животное	Облученное животное	Количество опытов	Достоверность
<i>n</i> + <i>m</i>	24,5 ± 3,5%	38,5 ± 9,75%	15	$p < 0,01$
<i>L</i>	36,0 ± 6,12%	30,6 ± 5,55%	16	$p < 0,01$
<i>k</i> ₁ и <i>k</i> ₂	26,6 ± 5,47%	17,5 ± 5,50%	18	$p < 0,01$
<i>h</i>	13,2 ± 2,8%	12,3 ± 5,70%	20	0,1 < p < 0,2

На основании результатов настоящего исследования можно заключить, что общее облучение белых крыс большими дозами рентгеновских лучей вызывает значительные нарушения в количественном синтезе водорастворимых белков миокарда. Эти изменения выражаются как в угнетении, так и усилении синтеза различных белков — ферментов, имеющих важное значение в клеточном метаболизме. Полученные данные также позволяют рекомендовать отечественную хроматографическую бумагу типа «Б» для электрофоретического разделения водорастворимых белков миокарда.

Институт физиологии им. академика Л. А. Орбели
Академии наук Армянской ССР

Ս. Ս. ՇՈՎՀԱՆՆԵՍՅԱՆ ԵՎ Տ. Ս. ԶԱՄԻՆՅԱՆ

**Միոկարդի ջրալուծ սպիսների անջատումը էլեկտրոֆորետիկ եղանակով
նորմալ և ճառագայթված կենդանիների մոտ**

Ժամանակակից գրականության մեջ սրտի և կմախքային մկանների սպիտների քանակական սինթեզի մասին ճառագայթային հիվանդության դեպքում տեղեկություններ չկան: Այդ պատճառով մենք ուսումնասիրել ենք սրտի մկանների ջրալուծ սպիտների հարաբերական քանակի սպիտակ առնետների մոտ: Կենդանիների ճառագայթումը կատարվել է ՌՌՄ-3 տիպի ապարատով (ընդհանուր ճառագայթում 500 Ռ/ժամ): Փորձերը ցույց են տվել, որ սրտի ջրալուծ սպիտների էքստրակտը հնարավոր է բաժանել բրոմատոգրաֆիկ թղթի վրա էլեկտրոֆորետիկ եղանակով 5—6 ֆրակցիայի: Մեր կողմից նկատվել են որոշ տարբերություններ սրտի և կմախքային մկաններից ստացված էլեկտրոֆորեդրամների միջև: Ճառագայթումից 9—10 օր հետո սրտի ջրալուծ սպիտների քանակական սինթեզը ենթարկվում է զգալի փոփոխությունների: նկատվում է միոգենային ֆրակցիայի ավելացում, ֆոսֆորիլազների քանակի իջեցում և ալդոլազայի քանակի որոշ պակասեցում: Միտալրումինի քանակը չի փոփոխվում:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ К. Стивенс, Т. Грей, М. С. Шварц, Am. Journ. Physiol. 175, 141 (1953).
² Р. Габриели, К. Чанг, Fed. Proc. 14, 53 (1955). ³ В. М. Родионов, Актуальные вопросы биохимии, т. 1, Биохимия белков, стр. 261 (1960). ⁴ Р. Кей, К. Энтмен, Arch. Biochim. Biophys. 62, 419 (1956). ⁵ Г. Тонини, Г. Муссере, Boll. del. Soc. Ital. Biol. Sperm. 33, 493 (1957). ⁶ М. Дюбуиссон, Biol. Rev. 25, 46 (1950). ⁷ П. Крепа, Biochim. Biophys. acta 9, 183 (1952). ⁸ С. Крук, Arch. Intern. physiol et Biochim. 65, 97 (1957).
⁹ С. С. Оганесян и Т. С. Заминян, V межд. биох. конгресс, т. 1, стр. 483 (1961).
¹⁰ А. Хаан, Biochim. Biophys. acta 11, 158 (1953). ¹¹ В. Блум, Histopathology of Irradiation. (1948).