Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 2

БИОФИЗИКА

А. М. КУЗИН, Л. Х. ЭЙДУС и Н. Б. СТРАЖЕВСКАЯ

ИЗУЧЕНИЕ ПРИ ПОМОЩИ МЕЧЕНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ВЛИЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ НА НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА И ЕГО СИНТЕЗ

(Представлено академиком А. И. Опариным 25 II 1955)

При изучении биологического действия радиации обращает на себя внимание кажущаяся резистентность белковых веществ к ионизирующему излучению. Свойства растворов простых белков (структурная вязкость, спектры поглощения) начинают изменяться лишь при дозах облучения в несколько сот тысяч рентгенов, в сотни раз превышающих летальные и сублетальные для живых организмов дозы. Попытки обнаружить изменения в структуре нативных белков in vivo при облучении животных малыми дозами радиации не привели к какому-либо результату. В опытах in vitro удалось наблюдать изменения в свойствах белков под действием малых доз рентгеновского излучения лишь при искусственных условиях эксперимента ([1], [2]).

Весьма скудны также сведения о воздействии малых доз излучения на синтез белка в организме, в частности совершенно не изучено влияние облучения на синтез белка в растениях. На животных такие опыты были проведены Хевеши ([3]) и Абрамсом ([4]). В первой из этих работ сравнивалось влияние рентгеновских лучей на синтез нуклеиновых кислот и белков у крысят, облученных дозой в 950 г. Показателем синтеза служила радиоактивность в этих веществах меченого углерода, введенного крысам в составе ацетата натрия. Наблюдалось резкое (в 2—3 раза) угнетение синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты в печени и других внутренних органах и в то же время некоторое усиление (на 15—30%) синтеза белка. Аналогичные результаты были получены во второй работе, в которой действию примерно тех же доз излучения подвергались кролики и крысы, а в качестве метки использовался углерод гликокола.

Нами исследовалось действие рентгеновских лучей на синтез белка в растениях. Объектом изучения служили двухдневные проростки пшеницы Лютесценс 062 урожая 1952 г., выращенные в чашках Коха на воде.

В основу эксперимента был положен установленный рядом исследователей факт, свидетельствующий о том, что при синтезе белка в среде, содержащей тяжелую воду D_2O, в нем обнаруживается прочно связанный дейтерий ([5], [7]). В одной из таких работ при гидролизе белков дейтерий был обнаружен практически во всех аминокислотах. Для создания в растениях такой дейтерированной среды проростки за 2 часа до облучения пересаживались в раствор, содержащий около 8% D_2O. Как показали контрольные опыты, этого времени заведомо достаточно для насыщения корней проростков раствором еще до облучения.

Растения облучались в течение 5 мин. рентгеновскими лучами дозой в 1000 г ($V = 190$ кв, $I = 5$ ма, картонный фильтр), после чего контрольные и опытные растения продолжали выращиваться в тех же растворах в

течение 24 час. Затем у проростков отделялись корни и стебли, из которых раздельно экстрагировались белки 10% раствором NaCl. Белки осаждались равным объемом 10% раствора трихлоруксусной кислоты, дважды промывались спиртом и трижды эфиром. При такой обработке в белках остается лишь прочно связанный дейтерий, концентрация которого и характеризует интенсивность синтеза нового белка.

Если облучение влияет на новообразование белка, то соотношение между новым, дейтерированным белком и белком, содержавшимся в растении до помещения его в раствор с тяжелой водой, в опыте и контроле должно быть различным.

Методика определения концентрации дейтерия в белках. Каждая проба белка получалась от 5—6 сотен проростков. Полученный в результате опыта препарат белка сжигался, образовавшаяся при этом вода улавливалась и очищалась от примесей. Затем в ней определялась концентрация тяжелой воды, отражающая степень дейтерированности белка. Перед сжиганием белок высушивался в вакуум-эксикаторе до постоянного веса, затем дополнительно сушился в вакуумной установке, откачиваемой до 10^{-1} мм рт. ст. Высушенный белок сжигался в токе кислорода в электрической печи, нагретой до температуры свыше 700°. Кварцевая трубка, в которой производилось сжигание, была заполнена проволочной окисью меди. Приемником воды служила ловушка, охлаждавшаяся сухой углекислотой, погруженной в метиловый спирт. Вода, образовавшаяся при сгорании белка, подвергалась затем многократной вакуумной перегонке с промежуточной обработкой хромовым ангидридом, едкой щелочью и марганцевокислым калием. Концентрация тяжелой воды определялась методом падающей капли на установке, аналогичной описанной в работе ([8]).

В табл. 1 приведены результаты трех опытов, в которых указанным методом обнаруживалось угнетение синтеза белка.

Концентрация D_2O в воде, полученной при сжигании белков облученных растений, оказалась на 15—25% меньше, чем у контрольных. Большее абсолютное содержание дейтерия в белке стеблей по сравнению с медленнее растущими корнями (как в опыте, так и в контроле) лишний раз подтверждает, что появление в белке стабильно связанного дейтерия вы-

Таблица 1

№№ опытов	Из какого органа взят белок	Вариант	Концентр. D_2O (%)	Опыт / контроль (по D_2O)	Активность C^{14} (имп/мин·мг)	Опыт / контроль (по C^{14})
1	Стебли	Опыт	0,72±0,02	0,82±0,06	—	—
		Контроль	0,88±0,04		—	
	Корни	Опыт	0,44±0,02	0,78±0,06	—	—
		Контроль	0,56±0,02		—	
2	Стебли	Опыт	0,68±0,01	0,65±0,02	40±3	1,42±0,21
		Контроль	1,04±0,01		28±2	
	Корни	Опыт	0,52±0,01	0,87±0,03	1270±15	1,43±0,11
		Контроль	0,60±0,01		885±70	
3*	Корни	Опыт	0,70±0,02	0,87±0,07	2305±15	1,32±0,03
		Контроль	0,80±0,04		1735±25	
4	Корни	Опыт	—	—	4220±80	1,39±0,05
		Контроль	—		3030±60	
5	Корни	Опыт	—	—	1475	1,42±0,08
		Контроль	—		1040	

* В опыте № 3 использовалась пшеница урожая 1954 г.; белки выделялись из растений через 26 час. после облучения.

звано интенсивным новообразованием белка *. Обнаружив указанным методом угнетение синтеза белка рентгеновским излучением, мы решили сопоставить его с широко используемым способом суждения об интенсивности синтеза белковых веществ по скорости включения в белок меченых аминокислот. В качестве таковой был избран гликокол, меченный (C^{14}) по углероду карбоксила. Во втором и третьем опытах, наряду с D_2O, в воду, в которой выращивались растения, добавлялся меченый гликокол. В двух других опытах (№№ 4 и 5) раствор содержал один лишь гликокол. Удельная активность растворов составляла в разных опытах от 0,02 до 0,06 μк/мл. При промере активности сухих препаратов белков оказалось, что в белках облученных растений активность C^{14} не только не меньше, но, наоборот, на 40% больше, чем в контроле (табл. 1).

В чем могла заключаться причина подобного расхождения при «метке» белка D_2O и гликоколом? Прежде всего было исследовано, не является ли это следствием нарушения ионизирующей радиацией поглощения корнями проростков воды или гликокола. В этом случае расхождение могло быть объяснено различной концентрацией этих веществ в опытных и контрольных растениях. Оказалось, что облучение дозой в 1000 г не нарушает поступления тяжелой воды в корни проростков пшеницы, а на поступление гликокола оказывает влияние. В первые часы после облучения корни опытных растений содержат меньше гликокола, чем у контрольных. Со временем различие уменьшается, и к 24-му часу после облучения в корнях опытных растений обнаруживается даже несколько бо́льшая активность C^{14}, чем у контрольных растений. Но различие в активности опытных и контрольных препаратов белка, обусловленное этими изменениями, могло составить лишь около 1% вместо 40% **, наблюдаемых на опыте.

Нами было высказано предположение, что причина различия лежит в адсорбции гликокола белками корней. Возможно, что под влиянием рентгеновского излучения изменяется строение поверхности белковых глобул, что отражается на способности белка адсорбировать аминокислоту, введенную в организм растения. Для проверки этого предположения в одном из опытов (№ 2 из табл. 1) белки корней перерастворялись в слабом (0,2%) растворе щелочи, содержащем в избытке обычный немеченый гликокол. После 24-часовой выдержки при комнатной температуре белки вновь осаждались и в них проверялась активность C^{14}. Адсорбированные молекулы аминокислоты в результате такой процедуры должны были в основном перейти в раствор в процессе обмена с молекулами немеченого гликокола. Результаты этого опыта полностью подтвердили высказанное предположение (табл. 2, опыт № 1).

Значительная часть активности из белков облученных растений перешла в раствор. Соотношение же между активностями опытных и контрольных препаратов белка стало близким к полученному с меткой по дейтерию (табл. 1).

В одном из опытов (табл. 2, опыт № 2) мы измеряли радиоактивность белков, выделенных из корней проростков сразу после их облучения. Перед облучением растения находились в течение 2 час. в растворе, содержавшем меченый гликокол. После же облучения они в раствор больше не погружались с тем, чтобы изменение проницаемости корней для гликокола не могло сказаться на результатах опыта. И в этом случае, так же как в опыте № 1, активность белков контрольных растений в результате их

---

* В опытах in vitro, проведенных совместно с Е. В. Будиловой на белках животного происхождения, было показано, что при облучении растворов белка не наблюдается какого-либо изменения их дейтерируемости прочно связанными атомами дейтерия, даже при дозе в 100 000 г. Поэтому объяснить меньшую концентрацию дейтерия в белках облученных растений влиянием излучения на дейтерируемость самих белковых молекул, имеющихся к моменту облучения, не представляется возможным.

** Если же учесть угнетение синтеза белка, то различие в показаниях по D_2O и гликоколу, естественно, превысит 40%.

переосаждения в избытке немеченого гликокола не изменилась. После вторичного переосаждения активность препарата осталась той же. Белки же облученных растений обладали до переосаждения значительно большей активностью, чем после него *.

Таблица 2

№№ опытов	Вариант	Активность C^{14} (имп/мин·мг)		$\frac{a}{б}$	$\frac{\text{Опыт}}{\text{Контр.}}$
		до „отмывки" *а*	после „отмывки" *б*		
1	Опыт	1270±15	815±60	1,56	0,91
	Контроль	885±70	895±15	~1	
2	Опыт	2310±35	1690±25	1,37	0,83
	Контроль	2060±10	2040±10	~1	

Очевидно, в наших экспериментах причина расхождения результатов, полученных с «меткой» D_2O и гликоколом, заключалась в абсорбции гликокола белковыми молекулами растений in vivo. Обнаружить указанный эффект удалось благодаря использованию тяжелой воды, на которой изменение адсорбционных свойств белка под действием рентгена не сказывается (или сказывается значительно слабее).

Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными в опытах in vitro с облучением белков сыворотки крови ([9]), в которых было обнаружено связывание белками меченного по сере метионина под влиянием различных денатурирующих воздействий, в частности при действии рентгеновских лучей дозой в 2000 г (при концентрации белка 2%, а в разбавленных растворах и при меньшей дозе).

Полученные результаты важны не только для выяснения механизма действия излучения на белки, но и с другой точки зрения. Если под влиянием радиации (а возможно, и в других условиях) белковые молекулы способны in vivo адсорбировать меченые соединения, вводимые в живые организмы, то без тщательных предосторожностей и контрольных экспериментов (которых в большинстве случаев обычно не производят) судить об интенсивности белкового обмена по «включению» аминокислот в эти белки нельзя, а выполненные на эту тему работы различных авторов нуждаются в серьезном критическом анализе.

Институт биологической физики
Академии наук СССР

Поступило
23 II 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] W. M. Dale, Biochem. J., **34**, 1367 (1940). [2] G. Barron, S. Dickman, J. General Physiol., **32**, 595 (1949). [3] G. Hevesy, Nature, **163**, No. 4153, 869 (1949). [4] R. Abrams, Arch. of Biochem., **30**, 90 (1951). [5] М. Г. Крицман, А. С. Коникова, Усп. совр. биол., **15**, № 1, 27 (1942). [6] H. H. Ussing, Skand. Arch. Physiol., **77**, 107 (1937). [7] J. A. Stekol, W. H. Hamill, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., **35**, 591 (1937). [8] P. R. Schloerb et al., J. Laborat. Clin. Med., **37**, 653 (1951). [9] Т. Е. Павловская, М. С. Волкова, А. Г. Пасынский, ДАН, **101**, № 4 (1955).

* Различие в активности препаратов котрольных и облученных белков после переосаждения последних в этом опыте может быть объяснено тем, что в течение 1½ час., прошедших от начала облучения до окончания операции отделения корней проростков и начала экстрагирования белков, процессы синтеза не были полностью остановлены.