Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 5

БИОХИМИЯ

М. А. ХЕНОХ и Е. М. ЛАПИНСКАЯ

ДЕЙСТВИЕ β-ИЗЛУЧЕНИЯ РАДИОАКТИВНОГО ИЗОТОПА ФОСФОРА (P^{32}) НА АМИНОКИСЛОТЫ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 4 II 1955)

Известно, что ионизирующее излучение вызывает в растворах белков ([1-3]), полисахаридов ([4, 5]), аминокислот ([6-9]) и сахаров ([4]) химические изменения. При этом происходит расщепление макромолекул, деструкция элементарных звеньев и денатурация белка.

Согласно литературным данным ([9, 10]) реакции, происходящие в водных растворах под влиянием ионизирующей радиации, обусловлены распадом воды на свободные радикалы и образованием H_2O_2.

В настоящем сообщении, в связи с работами по изучению действия внешнего радиоактивного излучения γ-лучей на высокомолекулярные соединения ([2, 4]), приводятся результаты по влиянию β-лучей непосредственно в самих растворах. В условиях описываемых экспериментов использовались дозы излучения P^{32} значительно бо́льшие (отличающиеся на 2—3 порядка), чем это имеет место при введении радиоактивного препарата в живой организм. В качестве источника β-лучей служил препарат P^{32} в виде раствора соли Na_2HPO_4. Вещества, подвергавшиеся облучению, готовились на растворах радиоактивной соли.

Приводимые значения удельной активности и концентрации фосфора относятся к приготовленным для облучения опытным растворам. Контрольной пробой служили растворы тех же соединений, приготовленные на обычной соли Na_2HPO_4, взятой в такой же концентрации, как и в опытных растворах. Определение аммиака проводилось диффузионным способом ([11]), аминный азот определялся в микроприборе Ван-Сляйка. Для опытов была использована фотожелатина (Ленинградского желатинового завода), содержащая после очистки по Лёбу 0,054% золы. Концентрация желатины определялась сжиганием белка по Кьельдалю и умножением найденного азота на 5,62. Формальдегид определялся колориметрическим способом ([12]).

Для устранения потерь аммиака во время облучения все опыты проводились при pH 2,5—3,6 и ставились не менее 3 раз. Ввиду опасности проведения экспериментов методика анализа предварительно отрабатывалась на нерадиоактивных растворах. Дозы излучения, выраженные в единицах рентгена, в отдельных опытах накапливались в течение от 3 до 28 суток и рассчитывались по формуле ([13]).

На рис. 1 приведены данные одного из опытов по влиянию P^{32} на 0,04 *M* растворы алифатических аминокислот. Кривые показывают, что выход аммиака от каждой аминокислоты растет с увеличением дозы облучения и зависит от длины цепи аминокислоты. Из кривых рис. 1 видно, что больше всего аммиака образовалось в растворе глицина, меньше в растворе аланина и еще меньше в растворе лейцина. Чем короче углеродная цепь аминокислоты, тем легче происходит дезаминирование. Например, при дозе облучения $800 \cdot 10^3$ r выход аммиака в растворе глицина составлял 0,33% от веса исходной аминокислоты, тогда как в растворе

лейцина при той же дозе облучения аммиака образовалось 0,06%. Более высокий выход аммиака в растворах глицина обусловлен, повидимому, тем, что под влиянием P^{32} α-аминокислоты с короткой углеродной цепью распадаются на меньшее число продуктов, способных подавлять дальнейшее окислительное действие свободных радикалов. В растворах же аланина и лейцина продукты деструкции, образующиеся в результате облучения, очевидно, могут более активно взаимодействовать со свободными радикалами воды и тем самым предохранять NH_2-группу от дезаминиро-

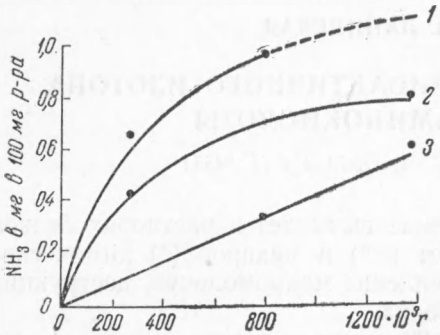


Рис. 1

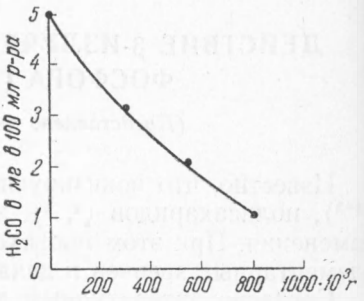


Рис. 2

Рис. 1. Образование NH_3 в облученных растворах: *1* — глицина, *2* — аланина, *3* — лейцина. Уд. активность 0,732 мк, Р 1,67 мг/мл

Рис. 2. Облучение H_2CO. Уд. активность 0,998 мк, Р 1 мг/мл

вания. Под влиянием облучения в алифатических аминокислотах происходит распад и углеродной цепи. В растворе, например, лейцина после действия P^{32} обнаруживается формальдегид и характерный неприятный запах. Альдегиды, образующиеся в результате распада аминокислоты, подвергаются под влиянием излучения P^{32} дальнейшему окислению.

На рис. 2 показаны результаты исследования действия P^{32} на формальдегид. Из рисунка видно, что излучение P^{32} приводит к уменьшению количества формальдегида. Доза облучения $808 \cdot 10^3$ г вызывала падение концентрации формальдегина на 77%.

Под влиянием P^{32} происходит также распад циклических аминокислот, например фенилаланина и тирозина. Растворы этих кислот в концентрации 0,04 *М* при действии P^{32} (уд. активность 0,910 мк, Р 6,8 мг/мл) подвергаются химическим изменениям, сопровождающимся побурением растворов и выделением аммиака. После облучения в растворах фенилаланина обнаруживался приятный запах цветов. В растворе тирозина доза $312 \cdot 10^3$ г вызывала образование 0,24 мг аммиака в 100 мл. Увеличение дозы облучения приводило к дальнейшему росту дезаминирования. При дозе $761 \cdot 10^3$ г аммиака выделилось 0,47 мг, а при $1190 \cdot 10^3$ г выход аммиака составлял 0,812 мг на 100 мл раствора тирозина, или 0,11% от веса исходной аминокислоты. Действие P^{32} вызывает также распад NH-связи. Облучение 0,02 *М* растворов гиппуровой кислоты дозой $761 \cdot 10^3$ г сопровождалось образованием 0,377 мг аммиака, а доза $1190 \cdot 10^3$ г повышала дезаминирование до содержания 0,510 мг аммиака в 100 мл кислоты. При этом растворы гиппуровой кислоты становились бурыми.

Представляло далее интерес выявление действия P^{32} на продукты неполного расчленения белковой молекулы. Для опытов использовался 0,79% раствор изо-желатины, приготовленный на 0,1 *н* H_2SO_4, который предварительно нагревался с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 5 час. В растворе желатины, не подвергавшейся действию P^{32}, было определено 1,58% аминного азота, после нагревания содержание аминного азота возросло до 2,46%. Раствор желатины после

термической обработки давал биуретовую реакцию и осаждался таннином. Результаты определения аминного азота и качественные реакции показывают, что во время нагревания желатина подверглась частичному гидролизу с разрывом пептидных связей (— CONH —), а следовательно, и укорочению полипептидных цепей.

Исходный и гидролизованный растворы желатины разбавлялись раствором радиоактивной соли до концентрации 0,1%. Дезаминирование, происходящее в желатине под влиянием P^{32}, показано на рис. 3. Из кривых рис. 3 видно, что с увеличением дозы облучения выделение аммиака возрастает

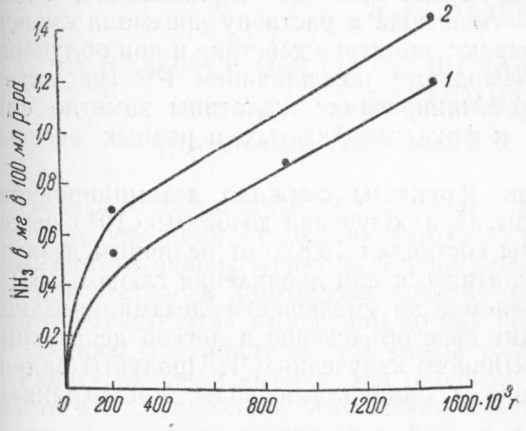


Рис. 1

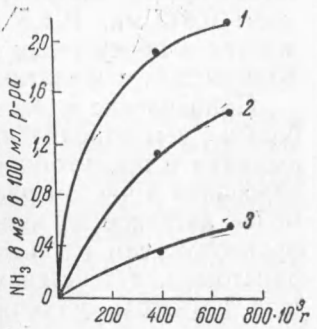


Рис. 2

Рис. 3. Образование NH_3 в облученных растворах желатины: *1* — исходной, *2* — гидролизованной. Уд. активность 0,76 мк, Р 0,2 мг/мл

Рис. 4. Образование NH_3 в облученных растворах: *1* — глицина; *2* — глицина + + глюкоза; *3* — глицина + мальтоза. Уд. активность 0,515 мк, Р 3,65 мг/мл

и что в гидролизованной желатине выход аммиака всегда больше, чем в исходной. Полученные результаты показывают, что под влиянием P^{32}, так же как и при действии облучения на аминокислоты, более короткие полипептидные цепи желатины активнее подвергаются дезаминированию, чем длинные. Последнее, очевидно, вызвано тем, что образующиеся при частичном гидролизе желатины свободные NH_2-группы менее устойчивы к воздействию β-лучей, чем связи — Co — NO—.

Влияние ионизирующего излучения в значительной степени может быть ослаблено добавлением к облучаемому раствору различных соединений ([14]). В частности, химическое действие, оказываемое излучением P^{32} в водных растворах аминокислот, уменьшается в присутствии углеводов. В описываемых опытах к 0,1 *М* растворам глицина (приготовленным на радиоактивной соли Na_2HPO_4) добавлялись глюкоза и мальтоза, концентрация которых после растворения была 0,1 *М*. Влияние сахаров на дезаминирование глицина под действием P^{32} показано на рис. 4, из которого видно, что после добавления к раствору глицина глюкозы и мальтозы выделение аммиака снижается. Рис. 4 показывает, что мальтоза оказывает больший эффект на уменьшение дезаминирования, чем глюкоза: при дозе облучения $412 \cdot 10^3$ г выход аммиака в растворе глицина в присутствии глюкозы составлял 58,2%, а в присутствии мальтозы 19,4% от величины дезаминирования исходного глицина.

Различие в защитном действии глюкозы и мальтозы зависит от молекулярного строения этих сахаров. Мальтоза содержит больше, чем глюкоза, функциональных групп и химических связей, могущих подвергаться окислению продуктами разложения воды (OH, HO_2, H_2O_2 и др.), образующимися при действии ионизирующего излучения на водные растворы углеводов.

Глюкоза, повидимому, более устойчива к облучению P^{32}. Добавление

крахмала к раствору аминокислоты также задерживает процесс дезаминирования. В 0,1 *М* растворе глицина, приготовленного на 1% растворе крахмала, образование аммиака под влиянием излучения P^{32} (уд. активность 0,91 мк, Р 6,8 мг/мл) при дозах $312 \cdot 10^3$ и $1190 \cdot 10^3$ г, соответственно, составляло 37,9 и 39,8% от выхода аммиака в растворе глицина, не содержащего крахмала. Оказывая на аминокислоту защитное действие от ионизирующего излучения, крахмал при этом подвергается глубокому химическому распаду. Так, после облучения раствора глицин + крахмал дозой $761 \cdot 10^3$ г иодная реакция давала вишневое окрашивание, а доза $1190 \cdot 10^3$ г вызывала от прибавления иода к раствору крахмала окраску коричневого цвета. Сахара оказывают защитное действие и при облучении белков. Было найдено, что происходящее под влиянием P^{32} (уд. активность 0,677 мк, Р 4,5 мг/мл) дезаминирование желатины заметно снижается в присутствии глюкозы и фруктозы, взятых в равных весовых количествах с желатиной.

Прибавление к раствору белка фруктозы снижало дезаминирование больше, чем прибавление глюкозы. При облучении дозой $919 \cdot 10^3$ г выход аммиака в присутствии фруктозы составлял 15,8% от величины дезаминирования в чистом растворе желатины, а при добавлении глюкозы 65%. Более активное влияние, оказываемое на уменьшение дезаминирования фруктозой, чем глюкозой, находит свое объяснение в легкой деструкции фруктозы под действием радиоактивного излучения ([4]). Продукты радиолиза фруктозы, вступая в реакцию с радикалами воды, предохраняют желатину от дезаминирования.

Результаты, приведенные в настоящей работе, показывают, что химические процессы, происходящие при действии излучения P^{32}, вызывают в растворах аминокислот, а также и желатины дезаминирование NH_2-группы, NH-связи и расщепление углеродной цепи. В этом отношении влияние P^{32} на аминокислоты сходно с действием ультразвуковых колебаний на те же соединения ([15–16]). Распад аминокислот под влиянием ионизирующего излучения P^{32} может быть частично предотвращен добавлением к облучаемому раствору углеводов. Защитная способность последних по отношению к аминокислотам различна и зависит от строения углевода.

Государственный естественно-научный институт
им. П. Ф. Лесгафта

Поступило
10 XII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] И. И. Жуков, В. А. Унковская, ЖРФХО, **62**, 581 (1930). [2] М. А. Хенох, ЖОХ, **11**, 776 (1941). [3] A. Hollaender (ed.), Radiation on Biology, **1**, part 1, 1954, p. 283. [4] М. А. Хенох, ЖОХ, **20**, 1560 (1950). [5] Л. К. Лозина-Лозинский, М. А. Хенох, Изв. Ест.-научн. инст. им. П. Ф. Лесгафта, **24**, 23 (1951). [6] B. E. Proctor, D. S. Bhatia, Biochem. J., **53**, No. 1, 1 (1953). [7] S. L. Whitcher, M. Rotheram, N. Todd, Nucleonics, **11**, No. 8, 30 (1953). [8] Действие излучений и применение изотопов в биологии, Сборн. рефератов и аннотаций иностранной периодической литературы, серия А, 1951—1953, ИЛ. [9] И. В. Верещинский, Усп. хим., **20**, в. 3, 288 (1951). [10] Радиационная химия, сборн. статей, ИЛ, 1953, стр. 151. [11] А. Н. Белозерский, Н. И. Проскуряков, Практическое руководство по биохимии растений, 1951, стр. 115. [12] М. В. Алексеева, Б. Е. Андронов и др., Определение вредных веществ в воздухе производственных помещений, 1949. [13] В. Бочкарев, И. Кеирим-Маркус и др., Измерение активности источников β- и γ-излучений, 1953, стр. 205. [14] W. M. Dale, Discuss. Farad. Soc., Radiation Chemistry, № 12, 293 (1952). [15] М. А. Хенох, Е. М. Лапинская, ДАН, 80, № 6, 921 (1951). [16] Е. М. Лапинская, А. Н. Миронова, М. А. Хенох, ДАН, **94**, № 1, 109 (1954).