

УДК 616.001.28:612.12

Е. Н. Панасюк, Б. И. Здравко

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СТРУКТУРА ГЕМОГЛОБИНА В ДИНАМИКЕ ОСТРОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ

Литературные данные, посвященные влиянию проникающей радиации на физико-химические свойства и структурную организацию макромолекул гемоглобина в условиях *in vivo* немногочисленны и противоречивы. До сих пор полностью не выяснены вопросы о нарушении различных уровней структурной организации гемоглобинов, выделенных из облученных организмов в динамике различных форм лучевой болезни.

С целью более углубленного изучения механизма действия проникающей радиации в сублетальных дозах на структурную организацию и обусловленные ею физико-химические свойства гемоглобина нами проведено исследование морфологического состава крови контрольных и облученных дозой 300 сГр (300 Р) морских свинок, качественное и количественное определение концентрации метгемоглобина в крови морских свинок, исследование формы кристаллов, электрофоретических свойств, аминокислотного состава и триптических гидролизатов гемоглобина морских свинок в динамике острой формы лучевой болезни.

Методика исследований

Опыты проведены на 118 морских свинок-самцах массой 450—550 г, из которых контрольную группу составляло 34 здоровых животных. Общее однократное облучение животных осуществляли аппаратом РУМ-11 соответственно рекомендациям ЦНИИРИ [8] при следующих физических условиях: напряжение 180 кВ, сила тока 20 мА, фильтры 0,5 мм $\text{Cu} + 1,0$ мм Al , мощность дозы $0,86 \cdot 10^{-4}$ Гр/с, расстояние источник — кожа 52 см. Общая доза облучения составляла 300 сГр (300 Р). Для подтверждения тяжести лучевой болезни нами проведен анализ крови (количество эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина) до облучения и в определенные сроки после облучения животных. Препараты гемоглобина выделяли из эритроцитов каждого облученного и контрольного животного по [17] на 1, 3, 6, 9, 12, 15, 26, 46, 66, 86 и 106 день после облучения. Концентрацию метгемоглобина в крови морских свинок определяли по [15]. В расчетах использовали миллиэквивалентные коэффициенты экстинкции окси- и метгемоглобина морских свинок по [6]. Форму кристаллов гемоглобина контрольных и облученных морских свинок исследовали и фотографировали с помощью микроскопа МБИ-6 при 280-кратном увеличении. Относительную электрофоретическую подвижность и гомогенность гемолизатов эритроцитов контрольных и облученных морских свинок исследовали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле по [18] с некоторой нашей модификацией [3]. Отделение гема от глобина осуществляли по [14]. Аминокислотный состав полученных глобинов изучали методом бумажной хроматографии по [2], руководствуясь методическими указаниями [7]. Трипсиновый гидролиз глобинов, высоковольтный электрофорез водорастворимых пептидов и последующую их хроматографию проводили по методам, описанным ранее [13].

Результаты исследований и их обсуждение

Для установления объективного критерия тяжести острой формы лучевой болезни, после облучения животных в сублетальной дозе, проводили анализ крови и учитывали процент гибели облученных морских свинок. Анализ форменных элементов крови до и после облучения подопытных животных дозой 300 сГр подтвердил развитие у каждого из них лучевой патологии, в ходе которой в течение 30 дней была выявлена 76 % гибель животных. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными об изменениях периферической крови и костномозгового кроветворения облученных морских свинок [1, 5, 9,

11]. Как видно из таблицы, у облученных животных с первого дня после облучения развивается лейкопения, которая приобретает наиболее резко выраженный характер в период 9—15 дней. В этот же период наблюдается развитие анемии и уменьшение концентрации гемоглобина. Следовательно, по гематологическим сдвигам наиболее ярко проявляется губительное воздействие проникающей радиации на кроветворные органы и на клетки периферической крови. Если теоретически допустить, что сразу после облучения животных прекращается митоз кроветворных клеток эритропоэтического ряда, то в течение 12 дней после облучения должно отмереть приблизительно 19 % эритроцитов, если исходить из того, что срок жизни эритроцитов морской свинки составляет 62 дня [16]. В действительности после облучения морских свинок дозой 300 сГр в течение 12 дней элиминирует не 19, а 40 % эритроцитов периферической крови. Этот факт свидетельствует о том, что и при воздействии на живые организмы сублетальных доз проникающей радиации не только нарушается митоз кроветворных клеток, но и наблюдается ускоренное старение и повышенная элиминация клеток из периферического русла крови, что в свою очередь ведет к развитию анемии и гибели большинства облученных животных.

С целью выяснения влияния проникающей радиации на первичную структуру гемоглобина мы изучали форму его кристаллов, аминокислотный состав и триптические гидролизаты гемоглобина контрольных и облученных морских свинок.

Известно, что гемоглобин с незначительно отличающимся аминокислотным составом (видовая специфичность) имеет различную форму кристаллов. Даже при замене одной аминокислоты на другую, например, при серповидно-клеточной анемии в β -цепи глутаминовая кислота (шестое положение) замещена валином, гемоглобин образует характерные паракристаллические агрегаты [19, 20], вследствие чего эритроциты становятся искривленными, приобретают неправильную, так называемую серповидную форму. Исходя из этих соображений, мы задались целью выявить хотя бы при микроскопическом исследовании разницу в форме кристаллов изучаемого гемоглобина контрольных и облученных морских свинок в динамике лучевой патологии. Однако видимых различий в форме кристаллов нами не обнаружено (рис. 1).

При исследовании формы кристаллов гемоглобина контрольных и облученных морских свинок выявлено, что данный гемоглобин имеет форму тетраэдра с двумя срезанными ребрами. Очевидно, что нарушение пространственной структуры гемоглобина, выделенного из крови облученных морских свинок, проявляется не во всех макромолекулах

и не в одинаково денатурированные бина способны с турированные м в растворенном Методом ка глобина (рН 5,3

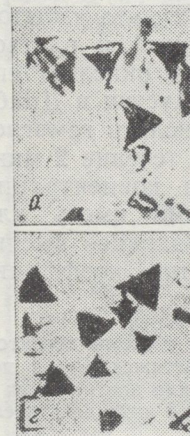


Рис. 1. Кр а — контроль;

свинок нами не облучения указ

В количест методу [15] в обнаружено воз с первого дня с родем. Если в свинок состав 19 день острой (см. таблицу).

Из получен метгемоглобина методами (мет

Данные анализов крови и концентраций метгемоглобина ($M \pm m$) морских облученных дозой 300 с

Компоненты крови	Контроль	Дни облучения						
		1	3	6	9	12	15	19
Количество эритроцитов в $10^{12}/л$ крови	5585200 ± 78950	4623000 ± 187000	4123000 ± 153000	4076000 ± 295530	3980000 ± 478700	336000 ± 880	3440000 ± 230580	4156000 ± 69557
Количество лейкоцитов в $10^9/л$	12120 ± 448	4933 ± 352	2833 ± 578	2400 ± 305	566 ± 123	$599 \pm$	1900 ± 971	6590 ± 16
Концентрация гемоглобина (г/л)	$172,4 \pm 6,8$	$144,0 \pm 8,1$	$116,0 \pm 7,2$	$118,7 \pm 7,0$	$116,3 \pm 13,9$	$106,5 \pm$	$92,7 \pm 14,4$	$92,7 \pm 14$
Концентрация метгемоглобина (г/л)	$31,3 \pm 1,6$	$78,0 \pm 11,2$	$72,7 \pm 13,2$	$61,9 \pm 17,4$	$70,3 \pm 6,6$	$113,4 \pm$	$70,3 \pm 11,9$	$83,9 \pm 23$

и не в одинаковой степени. Поэтому неденатурированные или слабо денатурированные радиацией и токсинами макромолекулы гемоглобина способны образовывать форму кристаллов, а более глубоко денатурированные молекулы не способны кристаллизоваться и находятся в растворенном состоянии.

Методом качественной спектрофотометрии водных растворов гемоглобина (рН 5,87) контрольных и облученных дозой 300 сГр морских

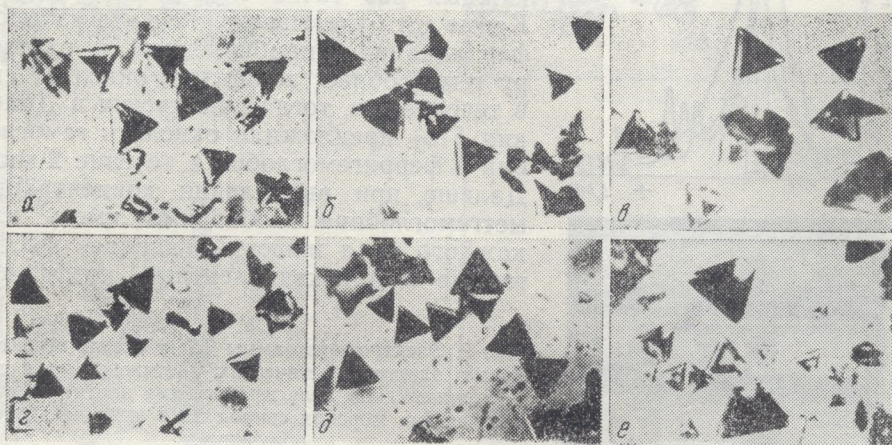


Рис. 1. Кристаллы гемоглобина контрольных и облученных морских свинок. а — контроль; б, в, г, д, е — соответственно на 1, 12, 26, 66 и 106 дни после облучения. $\times 560$.

свинок нами не обнаружено следов метгемоглобина, также как и после облучения указанных животных в дозе 600 сГр (600 Р) [3, 4].

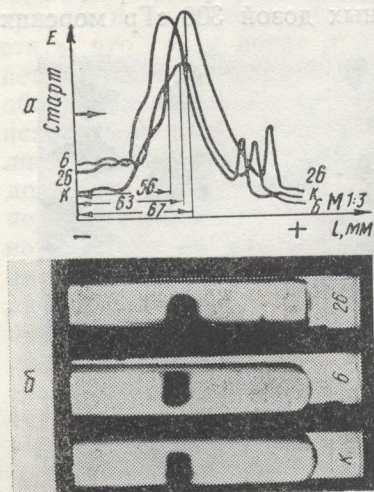
В количественном определении метгемоглобина по классическому методу [15] в крови морских свинок, облученных дозой 300 сГр, нами обнаружено возрастание концентрации метгемоглобина почти на 50 % с первого дня острой формы лучевой патологии по сравнению с контролем. Если в норме концентрация метгемоглобина в крови морских свинок составляет 3,13 % от общего гемоглобина, то в период 9—19 день острой формы лучевой болезни она увеличивается в 2,5—4 раза (см. таблицу).

Из полученных экспериментальных данных видно, что определение метгемоглобина в крови облученных морских свинок двумя разными методами (методом качественной спектрофотометрии и методом

облученных дозой 300 сГр (300 р) в разные сроки (дни) после облучения

Дни после облучения	15	19	26	46	66	86	106
3360000 $\pm$ $\pm$ 880800	3440000 $\pm$ $\pm$ 230580	4156000 $\pm$ $\pm$ 695570	4193000 $\pm$ $\pm$ 113290	5046000 $\pm$ $\pm$ 18257	5230000 $\pm$ $\pm$ 152750	4580000 $\pm$ $\pm$ 371720	5852000 $\pm$ $\pm$ 508260
599 $\pm$ 132	1900 $\pm$ 971	6590 $\pm$ 1628	13060 $\pm$ 543	9130 $\pm$ 1128	12400 $\pm$ 1095	7766 $\pm$ 1109	11220 $\pm$ 1075
106,5 $\pm$ 19,5	92,7 $\pm$ 14,4	92,7 $\pm$ 14,4	108,0 $\pm$ 2,3	133,3 $\pm$ 3,6	156,0 $\pm$ 3,5	126,3 $\pm$ 6,8	137,3 $\pm$ 1,5
113,4 $\pm$ 59,9	70,3 $\pm$ 11,9	83,9 $\pm$ 23,3	56,9 $\pm$ 13,2	65,9 $\pm$ 13,9	57,4 $\pm$ 15,5	36,5 $\pm$ 16,3	53,3 $\pm$ 10,7

Аустина—Драбкина) показало противоречивые результаты. Сравнив эти два метода, мы пришли к выводу, что метод Аустина—Драбкина объективно не отражает истинной картины количества метгемоглобина в крови облученных животных, ибо в начале развития острой формы лучевой болезни в 1 мл крови всегда находится уменьшенное количество эритроцитов. Следовательно, мы никогда не получим у каждого



облученного и контрольного животного каждый раз точно 1 % раствор крови. Кроме того указывают [12], что избыток феррицианида, прибавленный к раствору гемоглобина, полностью окисляет его в течение 2 ч, тогда как Аустин и Драбкин [15] предложили окислять гемоглобин в ферригемоглобин в течение 2 мин. Дальше, при вычислении концентрации метгемоглобина необходимо иметь для каждого вида животных заранее вычисленные миллиэквивалентные коэффици-

Рис. 2. Электрофореграммы (б) и схемы денситограмм электрофоретических растяжек (а) в полиакриламидном геле гемоглобина контрольных и облученных морских свинок на 6 и 26 день после облучения.

енты экстинкции окси- и метгемоглобина. Учитывая эти серьезные недостатки метода Аустина—Драбкина, мы считаем, что его не следует рекомендовать для количественного определения метгемоглобина в крови, особенно в процессе развития лучевой патологии.

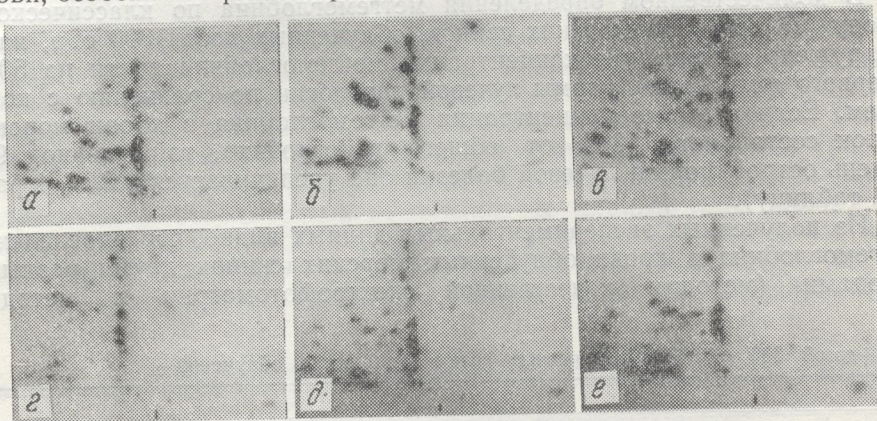


Рис. 3. Пептидные карты трипсиновых гидролизатов гемоглобина контрольных и облученных морских свинок.

а — контроль, б, в, г, д, е — соответственно на 1, 12, 46, 66 и 106 дни после облучения.

При анализе электрофоретических растяжек в полиакриламидном геле гемоглобина облученных морских свинок и их денситограмм нами не обнаружено никакой дополнительной фракции аномального гемоглобина, синтезированного *de novo*, а отмечено уменьшение (на 1—2 мм) относительной электрофоретической подвижности гемоглобина большинства облученных животных в начальный период (6—19 дней). В период с 26 по 46 день после облучения выявлено увеличение относительной подвижности гемоглобина (также на 1—2 мм) по сравнению с контролем (рис. 2).

Уменьшение относительной электрофоретической подвижности гемоглобина облученных животных в ранний период острой формы луче-

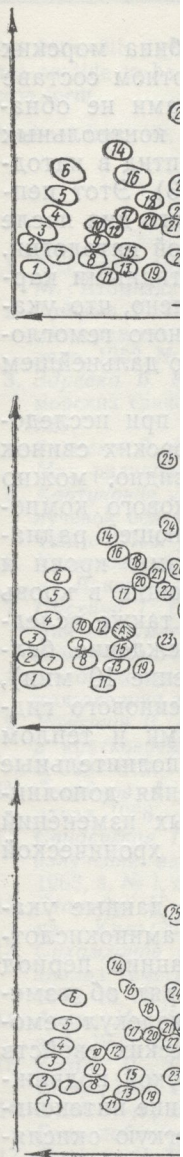


Рис. 4. Схемы пептидных карт.

а — контроль, б, в, г, д, е — соответственно на 1, 12, 46, 66 и 106 дни после облучения.

вой болезни, иной структуры, ствие прямого действия разл

Увеличение период интенсивности можно объяснить ственной структурой на их зарядов по сравнению с контролем

При изучении химическую) ст

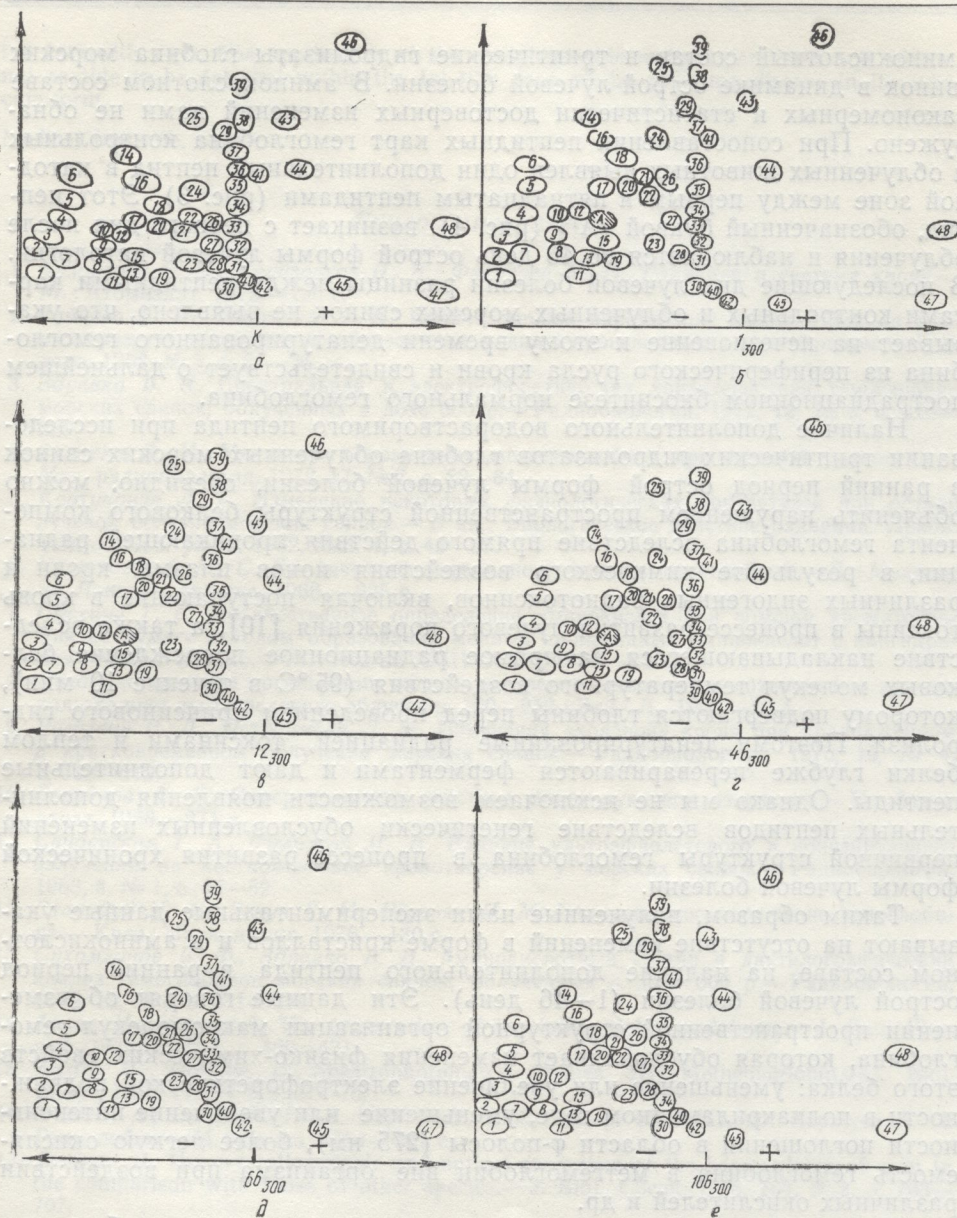


Рис. 4. Схемы пептидных карт трипсиновых гидролизатов гемоглобина контрольных и облученных морских свинок.

а — контроль, б, в, г, д, е — соответственно на 1, 12, 46, 66 и 106 дни после облучения. По вертикали — хроматография, по горизонтали — электрофорез.

вой болезни, вероятно, также обусловлено изменением пространственной структуры (т. е. денатурацией) макромолекул гемоглобина вследствие прямого воздействия проникающей радиации и химического воздействия различных радиотоксинов.

Увеличение электрофоретической подвижности гемоглобина в период интенсивного возобновления биосинтеза эритроцитов, очевидно, можно объяснить существованием более компактной нативной пространственной структуры молодых макромолекул гемоглобина и преобладанием на их поверхности относительно большего числа отрицательных зарядов по сравнению с контролем.

При изучении влияния проникающей радиации на первичную (химическую) структуру макромолекул гемоглобина, нами исследованы

аминокислотный состав и триптические гидролизаты глобина морских свинок в динамике острой лучевой болезни. В аминокислотном составе закономерных и статистически достоверных изменений нами не обнаружено. При сопоставлении пептидных карт гемоглобина контрольных и облученных животных выявлен один дополнительный пептид в катодной зоне между первым и пятнадцатым пептидами (рис. 3). Этот пептид, обозначенный буквой «А¹» (рис. 4), возникает с первого дня после облучения и наблюдается по 46 день острой формы лучевой патологии. В последующие дни лучевой болезни разницы между пептидными картами контрольных и облученных морских свинок не выявлено, что указывает на исчезновение к этому времени денатурированного гемоглобина из периферического русла крови и свидетельствует о дальнейшем пострадиационном биосинтезе нормального гемоглобина.

Наличие дополнительного водорастворимого пептида при исследовании триптических гидролизатов глобина облученных морских свинок в ранний период острой формы лучевой болезни, очевидно, можно объяснить нарушением пространственной структуры белкового компонента гемоглобина вследствие прямого действия проникающей радиации, в результате химического воздействия ионов плазмы крови и различных эндогенных радиотоксинов, включая поступающие в кровь токсины в процессе развития лучевого поражения [10], а также вследствие накладывающегося на прямое радиационное повреждение белковых молекул температурного воздействия (95 °C в течение 10 мин), которому подвергаются глобины перед проведением трипсинового гидролиза. Поэтому денатурированные радиацией, токсинами и теплом белки глубже перевариваются ферментами и дают дополнительные пептиды. Однако мы не исключаем возможности появления дополнительных пептидов вследствие генетически обусловленных изменений первичной структуры гемоглобина в процессе развития хронической формы лучевой болезни.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные указывают на отсутствие изменений в форме кристаллов и в аминокислотном составе, на наличие дополнительного пептида в ранний период острой лучевой болезни (1—46 день). Эти данные говорят об изменении пространственной структурной организации макромолекул гемоглобина, которая обуславливает изменения физико-химических свойств этого белка: уменьшение или увеличение электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле, уменьшение или увеличение интенсивности поглощения в области ф-полосы (275 нм), более легкую окисляемость гемоглобина в метгемоглобин вне организма при воздействии различных окислителей и др.

Проведенные нами исследования дают возможность глубже изучить молекулярные механизмы радиационного повреждения белков и более определенно подойти к проблеме устранения последствий лучевого поражения.

E. N. Panasyuk, B. I. Zdravko

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND STRUCTURE OF HEMOGLOBIN IN DYNAMICS OF ACUTE RADIATION SICKNESS

Summary

A shape of crystals, electrophoretic properties, amino acid composition and tryptic hydrolysates of hemoglobin studied in dynamics of acute radiation sickness in guinea-pigs. No distinctions from the norm are found in the shape of 280-fold magnified crystals and in the amino acid composition of hemoglobin in 300 cGy irradiated guinea-pigs. The method of qualitative spectrophotometry revealed no methemoglobin traces. The method of disk electrophoresis in polyacrylamide gel shows a decrease (by 1-2 mm) in the relative electrophoretic mobility of hemoglobin for most of irradiated animals in the period between the 6th-19th days and an increase in the electrophoretic mobility on

the 26th-46th days. The peptide to be detected in the acute form.

Medical Institute, Lv

1. Белоусова О. И. М.: Атомиздат, 1968.
2. Зайцева Г. Н., матограмма по делу, 1958, № 3.
3. Здравко Б. И. морских свинок, 829.
4. Здравко Б. И. Мед. радиобиол. 1968, 1, № 1.
5. Ковтунович Л. лучевой болезни. Изд-во Льв. ун-та, 1968.
6. Кушаковский М. на Ленингр. отд. 1968, 1, № 1.
7. Пасхина Т. С. фии на бумаге м. ном: Метод. пис. 1968, 1, № 1.
8. Рекомендации п. пользования реп. 1968, 1, № 1.
9. Рогозкин В. Д., и кратковремен. с. 608—612.
10. Свердлов А. Г. издат, 1968.—271.
11. Свицерская Т. излучений на к. 1963, 3, № 1, с. 4.
12. Стародуб Н. Ф., на.— Киев: Наук. 1968, 1, № 1.
13. Сухомлинов Б. анализ гемоглоб. 1972, 12, № 3, с. 1.
14. Anson M., Mirskiol., 1930, 13, N 1.
15. Austin H., Drabkin D., Chem., 1935, 112, 1.
16. Bush J. A., Berl G. Гемоглобин.— М. 1968, 1, № 1.
17. Drabkin D. The comparison v. 1968, 1, № 1.
18. Fawcett J. S. I. Letters, 1968, 1, N 1.
19. Harris J. M. St. tion in sickle cel. N 1, p. 197—200.
20. Perutz M. F., M. 1950, 166, p. 667—

Львовский медицинский институт

the 26th-46th days. The application of the dactylographic method permitted one additional peptide to be detected within the 1st-46th days of the radiation disease in its subacute form.

Medical Institute, Lvov

Список литературы

1. Белоусова О. И., Горизонтов П. Д., Федотова М. И. Радиация и система крови.— М.: Атомиздат, 1979.—126 с.
2. Зайцева Г. Н., Тюленева Н. П. Количественное определение аминокислот на хроматограммах посредством образования медных производных с нингидрином.— Лаб. дело, 1958, № 3, с. 24—26.
3. Здравко Б. И. Спектральная и электрофоретическая характеристики гемоглобина морских свинок, облученных в дозе 600 р.— Радиобиология, 1972, 12, № 6, с. 826—829.
4. Здравко Б. И. Механизм образования метгемоглобина при лучевой патологии.— Мед. радиобиология, 1972, 17, № 7, с. 82—84.
5. Ковтунович Л. Г. Изменение некоторых физиологических показателей при острой лучевой болезни морских свинок.— В кн.: Биологическое действие радиации. Львов: Изд-во Льв. ун-та, 1962, вып. 1, с. 43—57.
6. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина.— Л.: Медицина Ленингр. отд-ние, 1968.—325 с.
7. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге методом образования медных производных аминокислот с нингидрином: Метод. письмо.— М.: Изд-во АМН СССР, 1959.—24 с.
8. Рекомендации при организации общего облучения животных и дозированию при использовании рентгеновского облучения 100—250 кВт.— Л., 1969.—29 с.
9. Рогозкин В. Д., Остроумова Л. М. Изменения «красной» крови при продолжительном и кратковременном облучении морских свинок.— Радиобиология, 1970, 10, № 4, с. 608—612.
10. Свердлов А. Г. Опосредованное действие ионизирующего излучения.— М.: Атомиздат, 1968.—271 с.
11. Свидерская Т. А., Филипсон И. Н. Влияние ультрафиолетового и ионизирующего излучений на костномозговое кроветворение у морских свинок.— Радиобиология, 1963, 3, № 1, с. 45—52.
12. Стародуб Н. Ф., Рекун Г. М., Шурьян И. М. Радиационное поражение гемоглобина.— Киев: Наук. думка, 1976.—130 с.
13. Сухомлинов Б. Ф., Здравко Б. И. Аминокислотный состав и дактилографический анализ гемоглобинов морских свинок, облученных в дозе 600 р.— Радиобиология, 1972, 12, № 3, с. 431—434.
14. Anson M., Mirsky A. The preparation of insoluble globin and heme.— J. Gen. Physiol., 1930, 13, N 1, p. 469—471.
15. Austin H., Drabkin D. Spectrophotometric studies. III. Methemoglobin.— J. Biol. Chem., 1935, 112, N 1, p. 67—70.
16. Bush J. A., Berlin N. J.— J. Exp. Med., 1955, 101, p. 451. Цит. по: Коржуев А. П. Гемоглобин.— М.: Наука, 1964.—287 с.
17. Drabkin D. The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species.— J. Biol. Chem., 1946, 164, N 2, p. 703—707.
18. Fawcett J. S. Isoelectric fractionation of proteins on polyacrylamide gels.— FEBS Letters, 1968, 1, N 1, p. 81—82.
19. Harris J. M. Studies on the destruction of red blood cells. VIII. Molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions.— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1950, 75, N 1, p. 197—200.
20. Perutz M. F., Mitchison J. M. State of haemoglobin in sickle cell anemia.— Nature, 1950, 166, p. 667—679.

Львовский
медицинский институт

Поступила в редакцию
25.XI 1980 г.