

<https://doi.org/10.3176/biol.1981.4.02>

УДК (577.2+576) : 539.1.04

Тоомас КЕЭП

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И СТРУКТУРУ МЕМБРАН ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР ТИМОЦИТОВ И ЭРИТРОЦИТОВ

Хорошо известно, что клетки тимуса отличаются высокой чувствительностью к действию как химических, так и физических факторов, в том числе и ионизирующего излучения. Гибель тимоцитов начинается уже при облучении дозами 50—100 Р. При 600 Р дегенерация тимоцитов начинается через 1—2 ч после облучения.

Одной из наиболее чувствительных к радиации структур клеток тимуса является ядерная мембрана, повреждение которой, как полагают, может привести к интерфазной гибели тимоцитов (Кузин, 1973). Значительные изменения ряда функций и свойств ядерных мембран этих клеток обнаруживаются уже в первые часы после облучения дозами до 1 кР. Так, например, почти полностью угнетаются синтез АТФ и дыхание ядер, наблюдаются выход из них цитохромов, а позднее и ингибирование гликолиза (Creasey, Stocken, 1959; Кузин, Таршис, 1969, 1970; Таршис и др., 1968; Сложенкина и др., 1969). Установлены исключительно высокая радиочувствительность ДНК-мембранного комплекса и то, что восстановление его происходит в ядрах клеток печени, а не тимоцитов. Полагают, что за наблюдаемую чувствительность ответственным является липидный компонент комплекса (Стражевская, Стручков, 1977). Возможно, что нарушение вышеотмеченных функций ядерных мембран тимоцитов опосредуется повреждением липидной фазы мембран. Известно, что при активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) нарушаются многие функции мембран, в том числе угнетаются окислительное фосфорилирование и гликолиз, высвобождаются мембраносвязанные ферменты, в частности цитохромы (Владимиров и др., 1975; Wills, 1971). Далее, результаты многих исследователей вполне определенно указывают на интенсификацию ПОЛ при облучении как *in vitro*, так и *in vivo* (Кудряшов, 1966; Козлов, 1973; Бурлакова, 1975; Wills, Wilkinson, 1967), а согласно гипотезе Н. Б. Тарусова (1962), активация окислительных процессов в липидах служит ведущим механизмом при развитии лучевого поражения.

Одним из возможных звеньев, через которые реализуется влияние ПОЛ на функции мембраны, может быть модификация структуры и физических свойств липидного бислоя. Показано, что как при ПОЛ, так и при облучении увеличивается вязкость липидной фазы мембран (Бурлакова и др., 1975; Добрецов и др., 1977). Однако, как полагают, маловероятно, что уменьшение ненасыщенности жирнокислотного фонда, лежащее в основе роста вязкости мембран, может внести заметный вклад в те значительные изменения функций мембран, которые являются следствием перекисного окисления (Владимиров и др., 1975). Поскольку частично или полное проникновение белковых молекул, в том числе и ферментов, в мембраны, а также конформация их имму-

билизованных участков обеспечиваются главным образом гидрофобными взаимодействиями между углеводородной частью липидного бислоя и гидрофобными участками белка (Gennis, 1977), то особое внимание следует уделять возможности ослабления этих взаимодействий за счет накопления в мембранах полярных продуктов ПОЛ. Имеются сведения о том, что ПОЛ приводит к уменьшению гидрофобного объема мембраны (Кочергинский и др., 1975). Кроме того, при действии радиации в мембранах эритроцитов происходят изменения, обуславливающие увеличение полярности вблизи триптофановых остатков мембраносвязанных белков (Yonei и др., 1979).

В данной работе представлены результаты исследования влияния гамма-облучения на активность ПОЛ в изолированных ядрах клеток тимуса и эритроцитов цыплят. Сделана попытка оценить влияние ПОЛ на свойства околоповерхностных и глубинных областей мембраны. С этой целью использовали флуоресцентные зонды 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС) и липорастворимый N-фенил-2-нафтиламин (ФНА-2), параметры флуоресценции которых существенно зависят от полярности среды, в частности от присутствия молекул воды в их микроокружении (Radda, Vanderkooi, 1972; Сергеев и др., 1974).

Материал и методика

Работу выполняли на ядрах, выделенных из эритроцитов и клеток тимуса 2—4-месячных цыплят породы белый леггорн. Ядра эритроцитов выделяли следующим образом. Эритроциты получали из свежей гепаринизированной крови центрифугированием при 3000 *g*, промыванием несколько раз в 0,25 *M* сахарозе, содержащей 0,003 *M* CaCl₂ и 0,01 *M* трис-НСl-буфера, при рН 7,2 и ресуспендированием в той же среде до концентрации, соответствующей четырехкратно разбавленной крови. К полученной суспензии добавляли *n*-октанол до конечной концентрации 0,012 *M*, после чего внешнюю оболочку эритроцитов разрушали гомогенизацией в микроразмельчителе РТ-2 в течение 2 мин при 5000 об/мин и 20 °С. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 1500 *g*, и выпавшие в осадок ядра промывали четыре раза средой выделения, не содержащей октанола, при 0—4°. Присутствие октанола во время гомогенизации суспензии необходимо, поскольку без него эритроциты не разрушаются. Следует также строго соблюдать его определенную концентрацию, так как при повышенном содержании октанола (0,06 *M*) ядра разрушаются, а при пониженном (0,004 *M*) — большая часть эритроцитов остается целой. Понижение или повышение температуры гомогенизации действует таким же образом, как и уменьшение или увеличение концентрации октанола.

Ядра из клеток тимуса получали разрушением нарезанной на куски ткани тимуса в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (2 мин, 1500 об/мин, 0—4°). Для выделения ядер с обеими оболочками использовали 0,25 *M* сахарозу (Allfrey и др., 1957), для получения ядер с внутренними мембранами — 1%-ную лимонную кислоту (Kleinzeller, 1965) и, наконец, в целях получения ядер, обедненных липидами, их обрабатывали после выделения по Олфри 1%-ным тритоном X-100 (30 мин, 20°). После получения очищенных ядерных фракций их промывали дополнительно средой инкубации, содержащей 0,011 *M* NaCl, 0,083 *M* KCl, 0,001 *M* MgCl₂, 0,002 *M* CaCl₂ и 0,05 *M* фосфатного буфера (рН 5,9) или 0,01 *M* трис-НСl-буфера (рН 7,2), и ресуспендировали в той же среде до содержания ядерного белка 2—3 мг/мл. Полученные суспен-

знии клеточных ядер разделяли на несколько порций, часть из которых использовали в качестве контроля, а часть облучали гамма-лучами ^{60}Co в дозах от 0,1 до 10 кР на установке «Луч-1» (мощность дозы 350 Р/мин) при 0—4°. Клеточные ядра брали для анализов в течение их двухчасовой инкубации в присутствии катализаторов ПОЛ Fe^{2+} и аскорбиновой кислоты в концентрациях 12 мкМ и 0,8 мМ или без добавления их.

Активность протекания ПОЛ оценивали по продуктам их разложения, дающим окрашенный комплекс с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Wilbur и др., 1949). В пробах для анализов осаждали нерастворимые в 15%-ной трихлоруксусной кислоте компоненты (10 мин, 4000 г) и к супернатантам добавляли равные объемы 0,5%-ного раствора ТБК и нагревали при 100° в течение 15 мин. Экстинкцию измеряли на спектрофотометре «Спектротом» при длине волны 532 нм. Результаты выражали в наномолях малонового диальдегида (МДА) на 1 мг ядерного белка, учитывая, что молярная экстинкция МДА равняется $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Владимиров, Арчаков, 1972, с. 242).

Об изменениях в структуре мембран клеточных ядер, происходящих в результате гамма-облучения и ПОЛ, судили по интенсивности флуоресценции связанных с ними ФНА-2 или АНС. Гидрофобный зонд ФНА-2 растворяли в этаноле, а АНС — в дистиллированной воде до концентрации 4 мМ. Непосредственно перед опытом основные растворы разбавляли в среде инкубации, добавляли к определенным порциям ядерных суспензий и через 5—10 мин измеряли интенсивность флуоресценции с возбуждением при 360 нм на флуорометре «Анализ-1», применяя интерференционные светофильтры с максимумами пропускания 413 нм для ФНА-2 или 480 нм для АНС. Во время измерения концентрация ФНА-2 составляла 3,75 мкМ, а АНС — 50 мкМ с содержанием ядерного белка в пробе 0,1—0,05 мг/мл. Интенсивность флуоресценции представлена в относительных единицах с учетом флуоресценции зонда в растворе и рассеивания ядер. Регистрацию спектров флуоресценции ФНА-2 проводили на спектрографе ИСП-51. В качестве возбуждающего света использовали линию 366 нм ртутно-кварцевой лампы СВД-120А. Детектором свечения служил ФЭУ-51. Представленные спектры не скорректированы. Белок определяли по биуретовой реакции (Gornall и др., 1949). Результаты средние для трех—шести опытов и обработаны статистически.

Результаты и обсуждение

Непосредственно после облучения ядер тимоцитов или эритроцитов образование ТБК-активных продуктов обнаруживается начиная с дозы 10 кР, а при облучении дозой 5 кР или меньше действие ионизирующего излучения проявляется лишь после дополнительной инкубации ядер. В облученных ядрах ПОЛ протекает интенсивнее при рН 5,9, чем при рН 7,2; пострadiационное добавление FeSO_4 и аскорбата заметно усиливает действие радиации. Характерным для ядер эритроцитов является S-образный ход дозовой зависимости образования вторичных продуктов ПОЛ (рис. 1, А), что указывает на наличие защитного фактора в их мембранах. Совершенно иная зависимость наблюдается при облучении ядер тимоцитов (рис. 1, Б): отсутствует лаг-период в выходе ТБК-активных продуктов, и активация ПОЛ происходит при более низких дозах радиации. Если в ядрах эритроцитов достоверная интенсификация ПОЛ наблюдается с дозы 5 кР ($P < 0,001$), то, как мы установили в отдельной серии опытов, облучение дозой

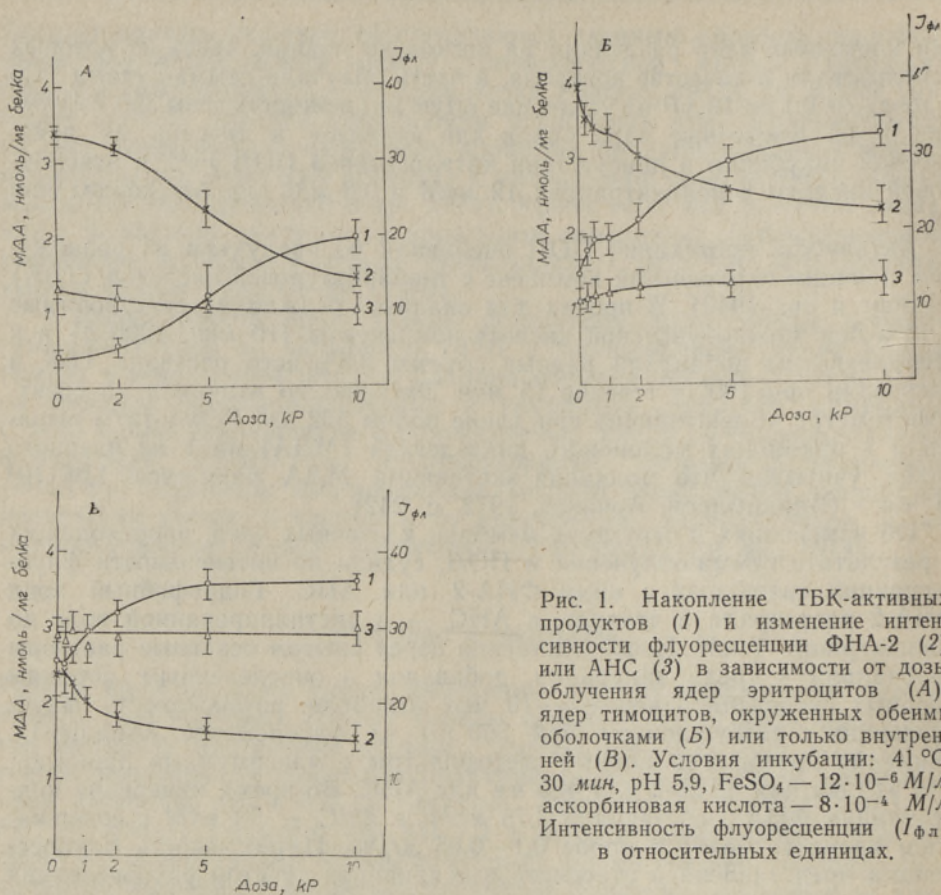


Рис. 1. Накопление ТБК-активных продуктов (1) и изменение интенсивности флуоресценции ФНА-2 (2) или АНС (3) в зависимости от дозы облучения ядер эритроцитов (А), ядер тимоцитов, окруженных обеими оболочками (Б) или только внутренней (В). Условия инкубации: 41 °С, 30 мин, pH 5,9, FeSO₄ — 12 · 10⁻⁶ М/л, аскорбиновая кислота — 8 · 10⁻⁴ М/л. Интенсивность флуоресценции (I_{Fl}) в относительных единицах.

0,1 кР увеличивает в ядрах тимоцитов, окруженных обеими оболочками (ядра I), выход ТБК-активных продуктов на 16% по сравнению с контролем ($n=6$, $P<0,001$). Следует обратить внимание на то, что эта доза вызывает первые серьезные нарушения некоторых функций ядерных мембран тимоцитов (Кузин, 1973). Несколько неожиданным является то, что рост количества вторичных продуктов ПОЛ в ядрах I замедляется при облучении дозами 0,5—1,0 кР и снова увеличивается при облучении дозами 2 кР и больше. Наблюдаемая фазность, по-видимому, указывает на наличие в мембранах двух фракций липидов, отличающихся по устойчивости к перекисному окислению. В ядрах тимоцитов, окруженных внутренней мембраной (ядра II), зависимость образования ТБК-активных продуктов от дозы облучения в общих чертах аналогична зависимости, наблюдаемой в ядрах I. Имеются, однако, и некоторые отличия. Во-первых, в ядрах II фон (необлученный вариант) перекисного окисления выше, чем в ядрах I, и, возможно, в связи с этим у первых после облучения наблюдается более интенсивное накопление ТБК-активных продуктов. Второе отличие наблюдается в кривых 1 на рис. 1, Б и В в области малых доз. В ядрах II при облучении дозами до 0,5 кР активность ПОЛ не отличается от таковой для контроля, кроме того, отсутствует перегиб, отмеченный в опыте с ядрами I. Поскольку выход продуктов деструкции липидов при соответствующих дозах радиации в ядрах II выше, чем в ядрах I, то можно предполагать более высокую радиочувствительность внутренних

ядерных мембран тимоцитов. Следует, однако, иметь в виду, что лимонная кислота, используемая для удаления внешней мембраны, может обуславливать разрыхление внутренней, а в поврежденных мембранах, как известно, липопероокисление протекает значительно интенсивнее, чем в нативных (Hatefi, Hanstein, 1970).

Обсуждая возможную причину различной радиочувствительности ядер эритроцитов и тимоцитов, еще раз необходимо обратить внимание на следующее обстоятельство. В необлученных ядрах эритроцитов ПОЛ не развивается в течение 60 мин инкубации в присутствии Fe^{2+} и аскорбата, для его активации следует применять сравнительно высокие дозы радиации. Следовательно, для того чтобы в ядрах эритроцитов индуцировалось ПОЛ, необходимо облучением разрушить какие-то компоненты мембран, предотвращающие повреждение липидов от окисления. Ядра тимоцитов, по-видимому, в этом не нуждаются, поскольку интенсивное протекание ПОЛ наблюдается в них и без действия ионизирующего излучения, и уже небольшие дозы увеличивают выход ТБК-активных продуктов. Отсюда вытекает, что содержание компонентов, обладающих антиокислительными свойствами, в ядрах тимоцитов существенно меньше, чем в ядрах эритроцитов. Этот вывод подтверждается результатами других авторов, согласно которым, с одной стороны, ПОЛ в эритроцитах после их ультрафиолетового облучения подавлено до тех пор, пока не разложена определенная доля локализованного в мембранах токоферола — одного из наиболее мощных жирорастворимых антиоксидантов —, а с другой, тимус относится к группе тканей с наиболее низкой антиокислительной активностью липидов (Пеленицын, 1976; Журавлев и др., 1965).

При связывании флуорофоров АНС, локализующегося благодаря наличию отрицательного заряда в околоповерхностном слое мембран, и ФНА-2, проникающего в углеводородную фазу, с ядрами тимоцитов или эритроцитов наблюдается многократное увеличение интенсивности их флуоресценции. В результате пострадиационного процесса ПОЛ частично теряется названная способность мембран (рис. 1, А, Б и В, кривые 2). При этом все особенности зависимости деструкции липидов от дозы в различных типах ядер отражаются и на подавлении флуоресценции ФНА-2. Ответ АНС при радиационном поражении мембран менее отчетлив. Тенденция к подавлению его флуоресценции наблюдалась лишь в ядрах эритроцитов.

Известно, что основными причинами уменьшения интенсивности флуоресценции флуорофоров является уменьшение количества связанного зонда или его квантового выхода. Из результатов измерения флуоресценции ФНА-2 в супернатанте контрольных и облученных 5 кР ядерных суспензий следует, что количество связанного зонда не зависит от облучения ядер (таблица). Относительные квантовые выходы ($Q_{отн.}$)

Количество связанного с ядрами ФНА-2 (нмоль/мг белка) и относительные квантовые выходы его флуоресценции

Условия опыта	Ядра эритроцитов		Ядра тимоцитов	
	Связанный ФНА-2	$Q_{отн.}$	Связанный ФНА-2	$Q_{отн.}$
Контроль	16,0±0,9	0,31	15,0±0,8	0,50
Облучение 5 кР	16,6±0,6	0,18	14,8±0,6	0,29
Обработка 1%-ным тритоном X-100	12,2±0,4	0,14	10,1±0,4	0,13

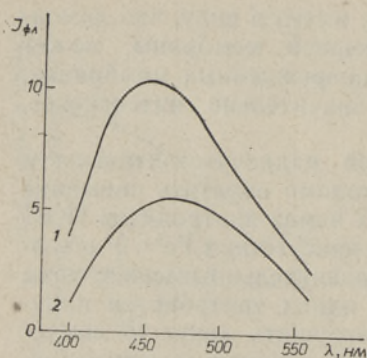


Рис. 2. Спектр флуоресценции ФНА-2, связанного с контрольными (1) и облученными (2) дозой 20 кР мембранами эритроцитов. Концентрация ФНА-2 $5 \cdot 10^{-6}$ М/л, белка 0,05 мг/мл.

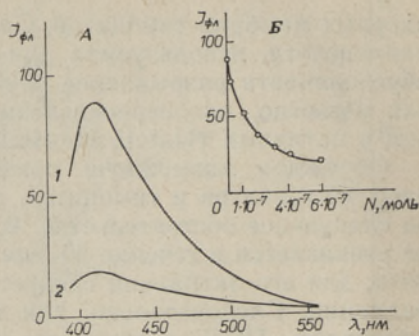


Рис. 3. Влияние ацетальдегида на флуоресценцию ФНА-2. А — спектры испускания ФНА-2 в гептане (1) и в присутствии $6 \cdot 10^{-4}$ М ацетальдегида (2). Б — зависимость тушения флуоресценции ФНА-2 при $\lambda_{\text{макс}}$ от количества добавленного ацетальдегида. Содержимое кюветы: гептан — $2,7 \cdot 10^{-2}$ М, ФНА-2 — $4 \cdot 10^{-7}$ М, ацетальдегид — $2 \cdot 10^{-5}$ М — $6 \cdot 10^{-4}$ М.

определяли по двойному реципрокному графику, построенному на основе измерений зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации ядерного белка в пробе. Сравнение контрольных и облученных ядер показывает, что для последних $Q_{\text{отн}}$ ФНА-2 в присутствии ядер эритроцитов или тимоцитов соответственно в 1,72 или 1,74 раза ниже. Соотношение $Q_{\text{отн}}$ зонда в контрольных и облученных ядрах хорошо совпадает с уменьшением интенсивности флуоресценции (в 1,7 раза). Процесс пострадиационного ПОЛ оказывает влияние и на положение максимума флуоресценции ФНА-2. В облученных мембранах эритроцитов кролика (3,2 нмоля МДА на 1 мг белка) по сравнению с контрольными максимум спектра испускания смещается в длинноволновую область примерно на 10 нм (рис. 2).

При поражении мембран перекисным окислением липидов на параметры флуоресценции связанных с ними флуорофоров, вероятно, действует ряд факторов. В модельных опытах нами оценивался возможный вклад изменения вязкости и содержания альдегидов или воды в системе на флуоресценцию ФНА-2. Для оценки влияния вязкости среды на интенсивность и максимум флуоресценции были сняты спектры испускания ФНА-2 в 75%-ном глицерине при температурах 20 и 50°. При нагревании глицерина, т. е. уменьшении его вязкости, наблюдается также уменьшение интенсивности флуоресценции на 15%, однако без изменения положения максимума спектра. Соответствие между накоплением ТБК-активных продуктов и подавлением флуоресценции ФНА-2 во всех типах ядер позволяет допустить, что ответ зонда при радиационном поражении в значительной мере обусловлен накоплением продуктов ПОЛ. Из рис. 3 видно, что альдегидная группа резко подавляет интенсивность флуоресценции флуорофора. Максимум флуоресценции ФНА-2 в гептане находится около 413 нм, и введение в систему ацетальдегида не изменяет его положения (рис. 3, А, кривые 1 и 2). Фактором, заметно влияющим на флуоресценцию ФНА-2, является полярность окружающей среды (Сергеев и др., 1974). Показано, что растворение близкого ему по структуре N-фенил-1-нафтиламина (ФНА-1) в средах с возраст-

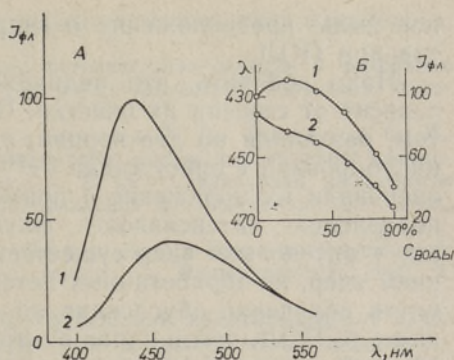


Рис. 4. Флуоресценция ФНА-2 ($5 \cdot 10^{-6}$ М/л) в системе диметилформамид — вода. А — спектры испускания ФНА-2 в диметилформамиде (1) и при увеличении доли воды в системе до 90% (2). Б — изменение интенсивности (1) и $\lambda_{\text{макс}}$ (2) флуоресценции ФНА-2 при увеличении содержания воды в системе до 90%.

тающей полярностью приводит как к тушению флуоресценции, так и к сдвигу максимума спектра в более длинноволновую область. Такие же изменения характеристик флуоресценции растворенного в диоксане ФНА-1 обнаружены при увеличении доли воды в среде (Träuble, Overath, 1973). С помощью аналогичных измерений для флуорофора ФНА-2 мы установили, что при увеличении содержания воды в диметилформамиде до 20%, интенсивность флуоресценции несколько увеличивается, при более высоких концентрациях — подавляется (рис. 4, Б, кривая 1). Максимум флуоресценции ФНА-2 в этой же системе при увеличении доли воды до 90% монотонно сдвигался в длинноволновую область примерно на 40 нм (кривая 2).

Приведенные результаты модельных опытов позволяют сделать некоторые предположения о природе ответа ФНА-2 на развитие в мембранах ПОЛ. Во-первых, роль возможного увеличения вязкости липидного бислоя незначительна. Во-вторых, тушение флуоресценции в облученных мембранах в значительной степени связано с образованием продуктов ПОЛ, в частности альдегидов. В-третьих, красный сдвиг спектра флуоресценции зонда обусловлен увеличением количества полярных группировок в углеводородном слое мембран, что может реализовываться путем проникновения молекул воды в глубину мембраны. Косвенным подтверждением влияния внутримембранной гидратированности на флуоресценцию ФНА-2 являются результаты опытов с ядрами, обработанными 1%-ным тритоном X-100. При сохранении морфологической целостности ядер детергентом удаляется большинство липидов (Tata и др., 1972) и, следовательно, вместе с тем значительная часть наиболее гидрофобной области, что создает условия для увеличения гидратированности мембранных структур. В присутствии обработанных детергентом ядер эритроцитов или тимоцитов по сравнению с контрольными $Q_{\text{отн}}$ ФНА-2 ниже соответственно в 2,2 или 3,8 раза при уменьшении связывания зонда в 1,3 или 1,5 раза (таблица). Параллельно с этим наблюдается сдвиг максимума спектра испускания ФНА-2 в длинноволновую область. Таким образом, резкое уменьшение гидрофобности мембран приводит как к тушению, так и к красному сдвигу максимума флуоресценции применяемого зонда. Различная природа подавления флуоресценции ФНА-2 в окисленных и очищенных тритоном X-100 ядрах согласуется с тем, что молекулы альдегида по сравнению с молекулами H_2O являются исключительно эффективными тушителями испускания этого флуорофора (рис. 3, Б и рис. 4, Б). Однонаправленный сдвиг положения максимума спектра флуоресценции ФНА-2 в облученных мембранах эритроцитов, в обработанных детергентом ядрах и в системе диметилформамид—вода подтверждает сделан-

ное выше предположение о гидратации внутримембранных компонентов при ПОЛ.

Надо добавить, что радиационное повреждение клеточных ядер зависит от степени их очистки. Оба типа ядер обрабатывали детергентом, разделяли на две порции, одну из которых облучали дозой 5 кР, инкубировали в присутствии Fe^{2+} и аскорбата в течении 60 мин и затем оценивали их поражение с применением флуорофора ФНА-2. Судя по подавлению интенсивности флуоресценции, радиационное повреждение «тритоновых» ядер существенно меньше по сравнению с повреждением ядер, не обработанных детергентом. Интересно, что в ядрах тимоцитов облучение обуславливало менее заметные изменения, характерные для ПОЛ, чем в ядрах эритроцитов. Отсюда можно заключить, что 1%-ный тритон X-100 удалял липиды из ядер тимоцитов полнее, и в структуре ядер эритроцитов оставалась достаточная для ответа ФНА-2 доля липидной фазы, т. е. прочность связывания липидов зависит от типа ядер. Этим же можно объяснить различное уменьшение связывания и $Q_{отн}$. ФНА-2 в «тритоновых» ядрах эритроцитов и тимоцитов, не подвергнутого облучению (таблица).

Из вышеприведенных результатов следует, что в ядерных мембранах радиочувствительных клеток по сравнению с радиорезистентными клетками устойчивость липидов к перекисному окислению существенно ниже. Так как прооксидантное действие гамма-облучения наблюдается в ядрах тимоцитов уже при дозе 0,1 кР, то интенсификация ПОЛ, учитывая большой спектр его действия, может лежать в основе их высокой радиочувствительности. Флуоресценция ФНА-2 эффективно тушится альдегидной группировкой, что, по-видимому, играет значительную роль в ответе этого флуорофора на ПОЛ. Для решения вопроса о том, обуславливает ли происходящая в ходе перекисного окисления деструкция липидов гидратацию внутримембранных структур, необходимо провести дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Бурлакова Е. Б., Голощапов А. Н., Заславский Ю. А. Роль липидов в структурных перестройках мембран клеток органов облученных животных. — Науч. совет АН СССР по проблемам радиобиологии. Информ. бюл., 1975, 18, 140—142.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
- Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Суслова Т. В., Потапенко А. Я. Механизм перекисного окисления липидов и его действие на биологические мембраны. — В кн.: Итоги науки и техники. Серия «Биофизика», т. 5. М., 1975, 56—117.
- Добрецов Г. Е., Петров В. А., Брошевская Т. А., Деев А. И., Владимиров Ю. А. Влияние перекисного окисления на физическую структуру фосфолипидных мембран. — Вопр. мед. химии, 1977, 23, 818—821.
- Журавлев А. И., Филиппов Ю. Н., Симонов В. В. Хемилуминесценция и антиокислительные свойства липидов человека. — Тр. МОИП. Биолуминесценция, 1965, 21, 75—89.
- Козлов Ю. П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М., 1973, 49—80.
- Кочергинский Н. М., Каган В. Е., Новиков К. Н., Давыдов Р. М. О возможности регуляции мембранами фоторецепторов кинетики неферментативных реакций. — *Studia biophysica*, 1975, 58, 43—50.
- Кудряшов Ю. Б. Роль липидных радиотоксинов в лучевом токсическом эффекте. — В кн.: Радиотоксины, их роль и природа в биологическом действии радиации высокой энергии. М., 1966, 105—119.
- Кузин А. М. Молекулярная радиобиология клеточного ядра. М., 1973, 86—111.
- Кузин А. М., Таршис М. А. К вопросу о радиационном нарушении синтеза АТФ в ядрах клеток вилочковой железы. — *Радиобиология*, 1969, 9, 755—757.

- Кузин А. М., Таршис М. А. Действие радиации на дыхание ядер тимоцитов. — Радиобиология, 1970, 10, 116—119.
- Пеленицын А. Б. Исследование перекисного фотоокисления липидов в мембранах эритроцитов и его роли в гемолизе при ультрафиолетовом облучении. Автореф. канд. дис. М., 1976.
- Сергеев П. В., Владимирова Ю. А., Сейфулла Р. Д., Данилов С. М., Денисов Ю. П. Применение флуоресцентных зондов для изучения взаимодействия стероидов с биомембранами. — В кн.: Структурная лабильность мембран и ее роль в регуляции функциональной активности клеток. Минск, 1974, 78.
- Сложенкина Л. В., Мигушина В. Л., Кузин А. М. Влияние облучения на гликолиз изолированных ядер клеток тимуса. — Радиобиология, 1969, 9, 686—691.
- Стражевская Н. Б., Стручков В. А. Организация надмолекулярных комплексов ДНК хроматина эукариот и их роль в радиационном эффекте. — Радиобиология, 1977, 17, 163—177.
- Тарусов Б. Н. Первичные процессы лучевого поражения. М., 1962.
- Таршис М. А., Утешев А. Б., Кузин А. М. Влияние γ -облучения на содержание цитохромов *b* и *c* в ядрах тимоцитов. — Докл. АН СССР, 1968, 181, 234—236.
- Allfrey, V. G., Mirsky, A. Z., Osawa, S. Protein synthesis in isolated cell nuclei. — J. Gen. Physiol., 1957, 40, 451—490.
- Creasey, W. A., Stocken, L. A. The effect of ionizing radiation on nuclear phosphorylation in the radiosensitive tissues of the rat. — Biochem. J., 1959, 72, 519—523.
- Gennis, R. V. Protein—lipid interactions. — Ann. Rev. Biophys. Biogen., 1977, 6, 195—238.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. — J. Biol. Chem., 1949, 177, 751—766.
- Hatefi, J., Hanstein, W. Lipid oxidation in biological membranes. I. Lipid oxidation in submitochondrial particles and microsomes induced by chaotropic agents. — Arch. Biochem. Biophys., 1970, 138, 73—86.
- Kleinezeller, A. Manometrische Methoden und ihre Anwendung in Biologie und Biochemie. Prag, 1965, 334—337.
- Radda, G. K., Vanderkooi, J. Can fluorescent probes tell us anything about membranes? — Biochim. Biophys. Acta, 1972, 265, 509—549.
- Tata, J. R., Hamilton, M. J., Cole, R. D. Membrane phospholipids associated with nuclei and chromatin melting profile, template activity and stability of chromatin. — J. Mol. Biol., 1972, 67, 231—246.
- Träuble, H., Overath, P. The structure of Escherichia coli membranes studied by fluorescence measurements of lipid phase transitions. — Biochim. Biophys. Acta, 1973, 307, 491—512.
- Wilbur, K. M., Bernheim, F., Shapiro, O. W. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids. — Arch. Biochem., 1949, 24, 305—313.
- Wills, E. D. Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. — Biochem. J., 1971, 123, 983—991.
- Wills, E. D., Wilkinson, A. E. The effect of irradiation on lipid peroxide formation in subcellular fractions. — Radiat. Res., 1967, 31, 732—747.
- Yonei, S., Todo, T., Kato, M. Radiation effects on erythrocyte membrane structure studied by the intrinsic fluorescence. — Int. J. Radiat. Biol., 1979, 35, 161—170.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
22/V 1981

Toomas KÕOP

GAMMAKIRGUSE MÕJU ERÜTROTSÜÜTIDE JA TÜMOTSÜÜTIDE ISOLEERITUD TUUMADE LIPIIDIDE PEROKSÜDATSIOONILE JA MEMBRAANIDE STRUKTUURILE

Ioniseeriv kiirgus aktiveerib lipiidide peroksüdatsiooni radiotundlike tümotsüütide tuumades väiksemate dooside korral (0,1 kR) kui resistentsete erütrotsüütide tuumades (5 kR). Vastavalt peroksüdatsiooni aktiivsusele toimuvad membraanides muutused, mis põhjustavad nende lipiidises faasis lokaliseeruva fluorofoori N-fenüül-2-naftüülamiini

(FNA-2) emissiooni intensiivsuse olulise languse ja spektri maksimumi nihke pikemalainelise piirkonna suunas. Interpreteerides seda mudelkatsetes saadud tulemuste pѳhjal, oletatakse, et membraanide kiirituskahjustusega kaasneva FNA-2 fluorestsentsi parameetrite muutumise korral omab olulist tѳahsusust peroksüdatsiooni laguproduktide, peamiselt aldehѳiidide moodustumine ja membraanisestest komponentide polaarsuse kasv, vѳimalik, et ka nende hѳdratatsioon.

Toomas KѳѳP

**THE INFLUENCE OF GAMMA-IRRADIATION ON THE LIPID PEROXIDATION
OF ISOLATED NUCLEI OF ERYTHROCYTE AND THYMOCYTE AND
ON THE STRUCTURE OF THEIR MEMBRANES**

The effect of gamma-irradiation on the lipid peroxidation (LP) of thymocyte and erythrocyte nuclei associated with changes in the characteristics of membranes are discussed. It appears from the research results that irradiation activates the LP in radio-sensitive thymocyte nuclei by smaller doses (0.1 kR) than that in resistant erythrocyte nuclei (5 kR). According to the activity of LP there were changes in the membranes which induced an essential drop in the intensity of fluorescent probe N-phenyl-2-naphthylamine (PNA-2) emission located in the lipid phase and the displacement of the maximum of spectrum in direction to longer wavelength.

On the ground of the model experiments it is supposed that in the changes of PNA-2 fluorescent parametrics by the radiation damages of membranes the most important factors are the constitution of decomposition products of LP (mainly aldehyde) and the growth of the polarity of membrane internal components which may be connected with their hydration.