

Радиационная инактивация протеолитических ферментов

М.А.Орлова

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119899 Москва, Ленинские горы, факс (095)939–0126

Обобщены данные по механизмам инактивации протеиназ в различных условиях и возможности применения этих процессов. Рассмотрены сериновые, сульфгидрильные, кислые и металлсодержащие протеазы. Особое внимание уделено конформационным изменениям в радиолитических процессах: зависимости их от pH среды и корреляции с изменением в аминокислотном составе ферментов.

Библиография – 90 ссылок.

Оглавление

I. Введение	529
II. Облучение протеиназ в твердом и иммобилизованном состояниях	530
III. Действие ионизирующего излучения на водные растворы протеолитических ферментов	531
IV. Применение метода радиационной инактивации протеолитических ферментов	543

I. Введение

Ионизирующее излучение занимает особое место в ряду воздействий на биообъекты. Это связано, во-первых, с тем, что существует естественный радиоактивный фон, стимулирующий изменение процессов, протекающих на Земле. Во-вторых, технологическое использование ионизирующего излучения и ядерных процессов привело к возможности направленного высвобождения огромного количества энергии и загрязнению экосистемы с последующим повышением природного радиоактивного фона и облучением малыми дозами населения; или в количественном выражении к значительному увеличению естественной годовой коллективной дозы облучения населения, которая до 1986 г. составляла примерно $3 \cdot 10^6$ чел. · Гр (см.¹). Очевидна важность изучения таких воздействий на человеческий организм в целом и на отдельные его системы с целью выявления адаптационных и защитных механизмов. Отличие ионизирующего излучения от других физико-химических воздействий состоит в уменьшении длины волны (< 100 нм) и возрастании энергии. Область ионизации начинается с энергии более 5 эВ. Взаимодействие ионизирующего излучения с веществом, в том числе и с биохимическими объектами, описано во многих монографиях.^{2–4} Не рассматривая здесь теоретические аспекты этого вопроса подробно, отметим лишь, что более важным и информативным для биохимии является изучение косвенного воздействия ионизирующего излучения через радикалы, образованные в результате радиолиза среды (в частности, воды). Основными продуктами радиолиза воды, как известно,⁵ являются следующие: H, OH, e_{aq}^- , O_2^{2-} , HO_2 , H_2O_2 . Радиационно-химический выход (G – количество образованного продукта на 100 эВ поглощенной энергии) зависит от присутствия примесей (доноров и акцепторов радикалов), pH раствора и других факторов.⁶

Взаимодействие биомолекулы с этими продуктами приводит к изменению и деструкции структур, в частности, обеспечивающих функционирование организма. Механизм таких процессов для простейших биомолекул (пептидов, аминокислот, белков) представлен в обзоре.⁷

Одним из путей нарушения жизнедеятельности организма следует считать дисбаланс процессов активации и инактивации ферментных систем, который при малых и хронических дозах облучения определенное время может не проявляться, ускоряя, однако, старение систем организма. В связи с этим, в настоящее время возрос интерес к изучению явлений, определяющих взаимозависимость функционирования отдельных систем, и комбинированных воздействий, которые предполагают наличие синергизма.⁸ Необходимость таких исследований связана с резким ухудшением радиэкологии на фоне бедственного экологического положения. Проблема выявления последствий влияния малых доз радиации, а также химических реагентов (радиомодификаторов) на результаты радиолитических процессов требует создания прогностических моделей. На сегодня их предложено немало, как чисто биологических, так и биохимических, в том числе и протеазных.⁹

Развитие радиотерапии также тесно связано с проблемами радиобиологии и поражения отдельных частей, клеток и микроструктур организма.¹⁰ Отчасти это является следствием использования новых излучателей (например, нейтронных^{11,12} или излучателей потоков тяжелых ионов^{13,14}), что требует дополнительных исследований в области относительной биологической эффективности этого воздействия на основные составляющие организма и различные клетки.

В последние годы стало очевидным, что определяющую роль в процессинге белка играют протеазы.¹⁵ Многие факты говорят за то, что протеолитические ферменты осуществляют функцию биологического контроля в организме, влияя на жизненно важные объекты. Целый ряд ключевых ферментов обмена находится под непосредственным контролем протеаз. Механизмы регуляции их активности могут осуществляться за счет активации зимогенов, баланса ингибитор–протеаза и локализации протеазы с субстратом. Поэтому неудивительно, что на разных этапах лучевого и термического поражения наблюдали изменение протеолитической активности,¹⁶ относя этот факт к патологии

М.А.Орлова. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры радиохимии Химического факультета МГУ, тел. 939–31–86

калликреин-кининовой системы.

Целью настоящего обзора является всестороннее рассмотрение механизма радиолитического протеаз и возможностей использования этого процесса в медицине и биотехнологии.

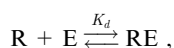
II. Облучение протеиназ в твердом и иммобилизованном состояниях

Облучение ферментов в твердом состоянии является первой ступенью исследования механизма их радиолитического, так как дает возможность изучать последствия прямого действия излучения, а не вторичных продуктов радиолитической среды. Это позволяет также в ряде случаев определять молекулярные массы как отдельных ферментов, так и сложных биологических образований. Исследования в этом направлении, начатые в 50-е годы,¹⁷ продолжают и сейчас, благодаря новой оценке возможностей радиационного метода определения молекулярных масс^{18, 19} и новым методам расчета.^{20, 21}

Считается, что при облучении биохимических объектов в сухом состоянии место действия излучения локализовано в точке попадания, в отличие от растворов, где эффективный объем увеличивается за счет диффузии продуктов радиолитической воды. Отчасти локализация наблюдается и при облучении замороженных растворов,²² хотя при последующем нагревании до комнатной температуры имеют место вторичные реакции. Во всех этих случаях применима теория мишени,²³ а основной количественной характеристикой процесса является зависимость эффект—доза, которая для протеаз обычно имеет экспоненциальный вид. В то же время встречающиеся отклонения от экспоненты дают возможность судить о механизме процесса, который может усложняться за счет передачи энергии по биосистеме.

При облучении ферментной системы передача энергии до наиболее радиочувствительной составляющей молекулы может значительно увеличивать эффективный объем,²⁴ доводя его до размеров целой биомолекулы, это сказывается и на величинах определяемых молекулярных масс. Так как инактивация системы при повышении температуры, как правило, изменяется, следует вводить поправку в расчеты молекулярной массы, что было продемонстрировано в работах.^{25, 26} Введение добавок, т.е. облучение смесей, содержащих несколько компонентов, также меняет степень инактивации самого фермента, например, в случае облучения смеси с глутатионом²⁷ или другим радиопротектором наблюдается уменьшение инактивации фермента.

В работах^{19, 20} рассмотрены теоретические вопросы определения размеров сложных равновесных ферментных систем, состоящих из неидентичных компонентов¹⁹ или одинаковых функциональных единиц.²⁰ В обоих случаях могут наблюдаться как простые экспоненциальные зависимости эффект—доза, так и более сложные выпукло-вогнутые кривые, что зависит от равновесия олигомер—мономер



где R — регуляторная единица, E — каталитическая единица, K_d — константа равновесия диссоциации.⁹

В зависимости от размера и концентрации компонентов, константы равновесия, относительной активности свободного фермента и ферментного комплекса, а также распределения компонентов между свободной и связанной формами в течение облучения будет меняться и кажущийся размер мишени, а следовательно, и величина получаемых молекулярных масс.

Анализ с помощью теории мишени также дает возможность получить представление о структурной организации сложных систем, что продемонстрировано на примере кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы²⁸ и компонентов системы аденилатциклазы в эритроцитах.²⁹ Присутствие и

влияние активатора или ингибитора также может быть определено по виду данной зависимости.²⁰ В ряде случаев так предлагается оценивать и роль переноса энергии олигомерных субъединиц при возможности моделирования диссоциации олигомерного комплекса.^{20, 28, 30, 31}

Рассмотрение вида зависимостей эффект—доза и применение теории мишени при облучении чистого фермента и ферментных комплексов с различной степенью взаимодействия в них компонент дает возможность не только развить теоретический анализ, но и определить влияние параметров на клеточные популяции,³² так и понять механизм инактивации конкретного фермента, который сам является сложной структурной реагирующей единицей.³³ Увеличение популярности метода радиационной инактивации для определения размеров систем обусловлено его простотой, применимостью к сложным объектам и возможностью использовать лишь частично очищенные препараты.

В литературе имеются сведения по инактивации сухих препаратов протеиназ: трипсина,^{23, 34–36} пепсина,²³ химотрипсина, папаина, субтилизина и карбоксипептидазы.^{34, 35} При облучении возникают два взаимосвязанных процесса: радикалообразование и инактивация. Радиационно-химический выход радикалов равен $\sim 1-7$. При этом γ -облучение дает информацию о распределении углеродных радикалов (например, в химотрипсине при 195 К), предшествующих вторичным радикалам, наблюдаемым при 295 К. Углеродные радикалы можно разделить на две группы: образующиеся при температуре ниже 195 К и не зависящие от аминокислотной последовательности, и образующиеся при температуре выше 195 К и зависящие от конформации конкретного нативного фермента.³⁷ Дозовые зависимости носят экспоненциальный характер, и реакция инактивации имеет первый порядок при γ - и X-облучении.

Для изучения повреждений, произведенных в молекулах ионизирующим излучением, удобно использовать последующее титрование, которое применялось в работе³⁸ для определения изменений, происшедших в α -химотрипсине после γ -облучения. На основании аминокислотного анализа титрованных образцов авторы делают вывод о конформационных превращениях, следствием которых являются изменение площади доступной поверхности молекулы и большее значение гидрофобных остатков.

В ряде работ облучение сухих ферментов проводили с целью выяснения их радиационной стабильности как таковой и в сравнении с устойчивостью к другим методам обработки. На рис. 1 приведены результаты, характеризующие потерю активности некоторых сухих протеаз при облучении.

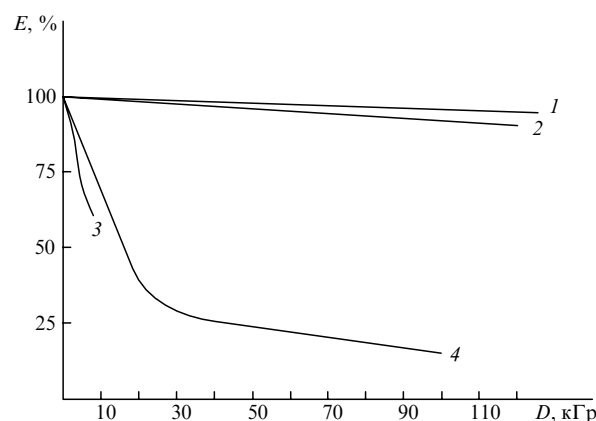


Рис. 1. Радиационная инактивация ферментов в кристаллическом состоянии: 1 — α -химотрипсин (X);³⁹ 2 — трипсин (γ);³⁶ 3 — глюкозидаза + каталаза (X);³⁹ 4 — субтилизин-72 (X)³⁹

Следует отметить, что наблюдаемая степень инактивации протеаз может зависеть от способа ее определения, что затрудняет возможность сравнения результатов различных работ. В частности, это наблюдается для химотрипсина, облученного в сухом состоянии.^{35, 36}

Как известно, имеет место повышение стабильности ферментов при их иммобилизации, и поэтому иммобилизованные ферменты активно применяются в народном хозяйстве, особенно в медицине. Существуют три направления изучения воздействия ионизирующего излучения на иммобилизованные ферменты. Первое – использование ионизирующего излучения собственно для иммобилизации. По этому вопросу имеется обширный литературный материал, который в данном обзоре не рассматривается.

Второе направление – разработка материалов для получения изображения (для применения в рентгеноскопии, автордиографии, дозиметрии). Так, в работе³⁹ проведено связывание α -химотрипсина и субтилизина-72 с различными диазидами и сополимером винилпирролидона и акролеина на хроматографической бумаге с целью получения скрытого изображения и детекции таким образом рентгеновского излучения. Авторы опробовали несколько вариантов метода: на подложку наносили растворы фермента ($2 \cdot 10^{-3}$ М α -химотрипсина, $1.1 \cdot 10^{-3}$ М субтилизина) и облучали X-лучами с мощностью дозы 200 рад/с; на подложку наносили фермент и диазид и облучали рентгеновским излучением, трансформированным специальным экраном в УФ-излучение с длиной волны 365 нм; предварительно обрабатывали хроматографическую бумагу диэтилацетатом *n*-азидобензальдегида, сополимером винилпирролидона и акролеина (ВПА) или ВПА, модифицированным азидными группами, с последующим экспонированием с ферментом. Дальнейшее проявление скрытого изображения подходящим красителем выявляет разницу в облученных и необлученных участках. При этом экспонирование рентгеновским излучением пропитанного раствором ферментов носителя приводит к иммобилизации 0.05% α -химотрипсина и 0.01% субтилизина.

Применение протеиназ для получения дозиметрических материалов описано в работе.⁴⁰ Использовалось действие низкоэнергетического β -излучения трития на желатиновые пленки, содержащие малые количества ферментов (химотрипсин, папаин, трипсин и субтилизин) и проявление после облучения в растворах этих ферментов. И в том, и в другом случае облучение практически не влияло на активность фермента, но нарушало структуру желатин, изменяя степень и условия переваривания ее ферментом. При окрашивании пленок образуется полутонное изображение, поэтому данный метод как и предыдущий, может быть использован для детекции ионизирующего излучения.

Третье направление исследований заключается в попытке смоделировать механизм воздействия ионизирующего излучения на иммобилизацию системы через исследование получающихся радикалов. Такие работы проведены для трипсина, иммобилизованного на диальдегидцеллюлозе (ДАЦ), в сравнении с чистым трипсином.^{41, 42} Интервал доз γ -облучения составлял 0.05–10 Мрад (0.5–100 кГр). Сравнение спектров ЭПР для иммобилизованного и нативного трипсина, а также для подложки, позволило предположить, что увеличение стабильности иммобилизованного трипсина связано с рекомбинацией радикалов трипсина с радикалами ДАЦ и с миграцией их к ослабленным связям в ДАЦ. При этом активность иммобилизованного трипсина не меняется, в то время как нативный трипсин теряет 25% своей активности при дозе 10 Мрад (100 кГр).⁴² Такое увеличение стабильности позволяет применять иммобилизованные протеазы в ферментотерапии с использованием γ -стерилизации,⁴³ так как активность γ -облученного иммобилизованного трипсина не меняется в процессе длительного хранения при одновременном

уменьшении количества радикалов. Трипсин, иммобилизованный на ДАЦ, может храниться в жестких условиях длительное время. Сравнение поведения ферментов при γ -облучении водных растворов и иммобилизованных на нейлоновых волокнах показало,⁴⁴ что не все ферменты в иммобилизованном виде значительно повышают свою радиорезистентность; однако это не относится к протеазам.

III. Действие ионизирующего излучения на водные растворы протеолитических ферментов

1. Сериновые протеиназы

Радиолиз сериновых протеиназ в растворах изучен наиболее полно. В литературе детально рассмотрены вопросы, связанные с механизмом радиационного повреждения трипсина и химотрипсина (ферменты поджелудочной железы), некоторых субтилизинов (ферменты микроорганизмов, продуцируемых различными штаммами *Bac. Subtilis*). Значительно менее изучены в этом отношении ферменты крови (тромбин, плазмин), а по некоторым ферментам информация в литературе не встречается.

Основной особенностью радиолитического повреждения сериновых протеиназ является достаточная устойчивость к действию ионизирующего излучения активных центров, содержащих остаток серина, в то время как наиболее уязвимой является конформационная устойчивость биомолекулы. В ряде работ^{45, 46} было показано, что основной вклад в инактивацию сериновых протеиназ вносят ОН-радикалы, получаемые при радиолизе воды. Это легко подтверждается при облучении химотрипсина в среде N_2O , где происходит увеличение количества ОН-радикалов за счет реакции



В этом случае наблюдается соответственно и увеличение радиационно-химического выхода инактивации.

В работах^{2, 3} приведены коэффициенты поражаемости (эффективность инактивации, т.е. вероятность, что атака данного активного вида инактивирует фермент) химотрипсина различными радикалами, наличие которых регулировалось условиями облучения (табл. 1, 2). Известны и величины констант скоростей реакций с некоторыми продуктами радиолиза воды (табл. 3). Показано, что изменения, вызванные радикалами ОН и Н, приходится в химотрипсине в

Таблица 1. Радиационно-химические выходы радикалообразования (G_R) и инактивации ($G_{ин}$) в водных растворах химотрипсина и папаина при γ -облучении в различных условиях

Среда	Радикалы	$G_{ин}$	Эффективность инактивации, f	G_R	f/G_R
<i>Химотрипсин</i> ⁴⁵					
Воздух	ОН	0.265	0.266	2.8	0.095
N_2O	$\left. \begin{matrix} 2 \text{ ОН} \\ \text{Н} \end{matrix} \right\}$	0.83	0.30	0.7	0.43
$N_2O + t\text{-BuOH}$	Н	0.091	0.091	0.7	0.13
Ar	$\left. \begin{matrix} \text{ОН} \\ \text{Н} \end{matrix} \right\}$	0.61	0.044	$\begin{matrix} 2.8 \\ 2.6 \end{matrix}$	0.17
Ar + $t\text{-BuOH}$	Н	0.234	0.143	2.6	0.055
<i>Папаин</i> ^{47, 48}					
N_2O	$\left. \begin{matrix} \text{ОН} \\ \text{Н} \end{matrix} \right\}$	—	—	5.9	0.43

Таблица 2. Эффективность инаktivации ферментов продуктами радиолиза воды

Реагенты	Трипсин ⁷⁵	Химотрипсин ⁴⁵
H	0.1	0.13
ОН	0.05	0.137
e_{aq}^-	0.09	0.055
H ₂ O ₂	0.04	—
HO ₂	0.04	—
O ₂	0.03	—

основном на остатки триптофана, а примерно 15% e_{aq}^- реагируют по S—S-связям. Поэтому следующим этапом изучения явилось выявление взаимосвязи между поражением остатков триптофана и конформационной устойчивостью.

В работах ^{49–51} проведен детальный анализ механизма инаktivации химотрипсина. Методом ¹H—³H-обмена ^{46, 50} было зафиксировано изменение доступной поверхности глобулы. Скорость обмена по мере роста дозы облучения от 30 до 50 Гр увеличивалась на 16% по сравнению с необлученным ферментом. Использование методов флуоресценции, вискозиметрии и микрокалориметрии позволило определить радиационно-химический выход развернутых молекул ($G_{разв}$) и найти корреляцию между $G_{разв}$ и радиационно-химическим выходом поврежденных остатков триптофана — $G(-Trp)$ ⁴⁹ (табл. 4). Данные по связыванию профлавина ⁵³ показали наличие локальных стерических изменений около связывающих центров. Первоначально конформационные изменения фиксировались лишь после дозы облучения ~ 2 кГр, ^{46, 49} однако позже были выявлены и при более низких дозах (< 1 кГр). ^{50, 51} Изменение квантового выхода флуоресценции облученных растворов химотрипсина, характеризующего количество остатков триптофана, показало, ⁵² что при pH 3 их уменьшение коррелирует с уменьшением каталитической активности. Для pH 7.8 (pH-оптимум эстеразной активности) первоначально наблюдалось увеличение доступных остатков триптофана, число которых при повышении дозы уменьшалось. Эти данные позволяют судить об изменении в развернутости глобулы химотрипсина в зависимости от pH. В частности, по-видимому, при низких pH площадь доступной поверхности глобулы выше. Максимальная разница в этой величине наблюдалась при pH 2.0, когда увеличивается радиационно-химический выход инаktivации. ⁵³ При дозах более 0.6 кГр конформационные изменения становились малозначимыми, но резко изменялся аминокислотный состав фермента. ⁵¹

Повреждение дисульфидных мостиков протекало при больших дозах облучения и уже не играло существенной роли в нарушении каталитической активности. Так, при дозе 0.5 кГр в химотрипсине наблюдали ⁵⁰ 5.5 связей S—S, при 0.8 кГр — 4. Оказалось, что наличие связей S—S важно

Таблица 3. Константы скоростей реакций протеиназ с продуктами радиолиза воды (γ -облучение)

Вещество	$k \cdot 10^{-10}, M^{-1} \cdot c^{-1}$			Ссылки
	e_{aq}^-	ОН	O ₂ ⁻	
Белки	5	1—6	< 10 ⁻⁷	23
Химотрипсин	—	3.7 ± 0.4	—	49
Папаин	4.1	4.7	—	48

для уменьшения конформационных изменений при облучении. Это было показано при сравнении γ -инаktivации химотрипсина и субтилизина, ⁵² когда при одной и той же степени инаktivации в субтилизине происходит разложение меньшего числа важных аминокислотных остатков. Такой вывод следует из сравнения величины $G(-Trp)/G_{ин}$, которая для субтилизина в 4.3 раза меньше, чем для химотрипсина при том, что $G_{ин}$ (субтилизина) < $G_{ин}$ (химотрипсина) в 1.4 раза (табл. 4). Аналогичная разница наблюдается и в случае суммарной величины $G(Tyr + Trp)/G_{ин}$. Объяснение этого факта авторы видят в наличии у химотрипсина пяти связей S—S (субтилизин — однопочечный фермент и дисульфидных мостиков не имеет), которые в условиях повреждения остатков триптофана как бы «поддерживают» структуру фермента.

Изменение аминокислотного состава химотрипсина при различных дозах облучения изучалось в работах. ^{50–52} Использовали 5·10⁻⁶–10⁻⁵М растворы с pH 3 (HCl) ⁵⁰ и 7.8 (трис-HCl буфер). ⁵² После облучения дозой 0.5 кГр наряду с повреждением остатков триптофана наблюдалось уменьшение числа остатков тирозина, а после 1.2 кГр — и остатков фенилаланина. ⁵⁰ При дозе около 1.6 кГр затрагиваются почти все аминокислотные остатки. Проведено ⁵² сравнение аминокислотного состава облученных растворов при pH 3 и 7.8. Общим для них является уменьшение числа остатков тирозина, цистеина, фенилаланина и лизина, однако, дозы, требуемые для этого, меньше при pH 3. Так, для разложения одного остатка тирозина требуется около 0.025 кГр при pH 3 и примерно 0.6 кГр при pH 7.8. Больший радиационный выход $G_{разв}$ химотрипсина при pH 3 по сравнению с pH 6.9 наблюдали и в работе. ⁴⁹ Сравнение данных различных работ говорит о том, что в силу более развернутой конформации повреждение аминокислотных остатков при облучении большими дозами при pH 3 носит стохастический характер, и, очевидно, изменение конформации имеет более важное значение для каталитической активности, чем изменение аминокислотного состава (исключая ароматические аминокислотные остатки).

Для облученных субтилизина-BPN' и субтилизина-72 (см. ^{52, 54}) наблюдалась корреляция между падением катали-

Таблица 4. Сравнение радиационно-химических выходов разворачивания молекул фермента ($G_{разв}$) и инаktivации ($G_{ин}$) с радиационно-химическим выходом разрушения аминокислотных остатков

Фермент	Условия облучения	$G_{разв}$	$G_{ин}$	$G(-Trp)$	$G(-Tyr)$	$G(-Trp)/G_{разв}$	$G(-Tyr)/G_{разв}$	Ссылки
Трипсин	HCl, pH 3.0	0.37	—	0.9	—	2.4	—	49
Химотрипсин	HCl, pH 3.0	0.43	—	1.2	—	2.8	—	49
Трипсин	H ₂ O, pH 6.6	0.32	—	0.7	—	2.2	—	49
Химотрипсин	H ₂ O, pH 6.6	0.31	—	1.1	—	3.5	—	49
Трипсин	Глициновый буфер, pH 6.9	0.26	—	0.6	—	2.3	—	49
Химотрипсин	Глициновый буфер, pH 6.9	0.18	—	0.6	—	2.5	—	49
Трипсин	Фосфатный буфер	0.36	—	0.9	—	2.5	—	49
Химотрипсин	Фосфатный буфер	0.30	—	0.9	—	3.0	—	49
Субтилизин-72	0.1 М NaCl, pH 5.6	—	0.23	0.19	0.35	0.82	1.5	52
	0.1 М NaCl + NaOH, pH 8.5	—	0.29	0.20	0.55	0.69	1.9	52
	Ацетатный буфер, pH 5.0	—	0.19	0.22	0.73	1.2	3.9	52

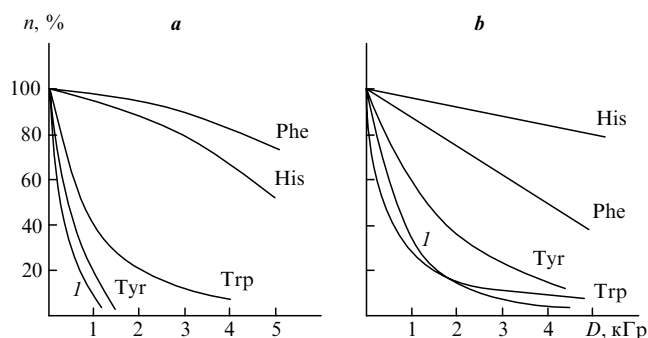


Рис. 2. Изменение количества аминокислотных остатков (n) в субтилизине-72 в зависимости от дозы облучения: a – pH 8.5, 0.1 M NaCl + NaOH; b – pH 5.0, $5 \cdot 10^{-3}$ M ацетатный буфер; 1 – изменение каталитической активности

тической активности и разрушением остатков тирозина, особенно при pH 8.5 (pH-оптимум действия фермента).⁵² При более низких pH (например, 5.5) эта корреляция менее выражена, так как имеется зависимость от разрушения остатков триптофана. Деструкция остатков гистидина, входящих в состав активного центра субтилизина-72, наблюдается при дозах более 5 кГр, когда каталитическая активность практически полностью потеряна. Для радиационной стабильности субтилизина-BPN' гистидин имеет более важное значение. При γ -облучении дозой 1.1 кГр субтилизин-BPN' лишается двух остатков тирозина, одного триптофана, одного метионина и одного гистидина^{54, 53} (рис. 2). Реакция с диизопропилфторфосфатом показывает, что при этом 85% активных центров сохранены. При дозе облучения 2.4 кГр появляются изменения в остатках лейцина, пролина, фенилаланина, серина и аланина. При этом окисление метионина не приводит к инактивации субтилизина-BPN' (см.⁵⁴), но существенно для субтилизина-Carlsberg,⁵⁵ который, по данным работы,⁵⁶ отличается от субтилизина-BPN' существованием ряда повторяющихся сегментов в полипептидной цепи. В субтилизине-72 при дозе 0.55 кГр по сравнению с субтилизином-BPN' увеличивается число разрушенных остатков тирозина, но не разрушается остаток гистидина.⁵² При дозе 1.1 кГр разница в числе разрушенных остатков тирозина еще более увеличивается. На основании этих данных сделаны выводы о большей доступности остатков тирозина в субтилизине-72.

Метод электрофореза для облученного субтилизина-IZT' показал⁵³ наличие большего электрического заряда по срав-

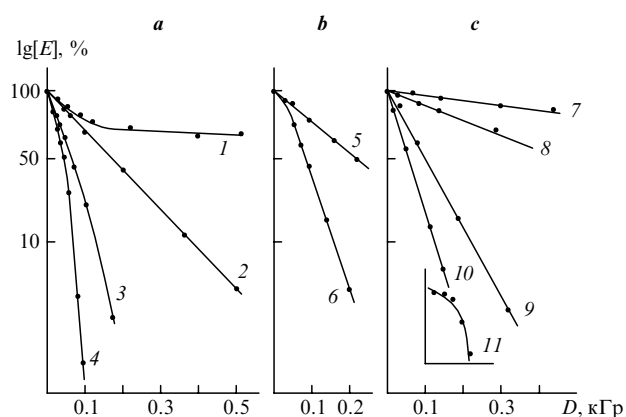


Рис. 3. Зависимости изменения каталитической активности ферментов от поглощенной дозы γ -излучения:³³ a – α -химотрипсин; b – трипсин; c – субтилизин-72; 1 – 10^{-4} , 2 – $7.5 \cdot 10^{-6}$, 3 – 10^{-6} , 4 – 10^{-7} , 5 – 10^{-5} , 6 – 10^{-6} , 7 – $5 \cdot 10^{-5}$, 8 – $5 \cdot 10^{-6}$, 9 – $9 \cdot 10^{-7}$, 10 – $3 \cdot 10^{-7}$, 11 – $8 \cdot 10^{-8}$ M

нению с нативным при отсутствии изменений в каталитической активности. Это согласуется с более ранними предположениями, что малые дозы облучения приводят к образованию неактивированных молекул, которые, однако, конформационно отличаются от нативных.

Появление активных, но частично поврежденных молекул, подтверждается уже при малых дозах облучения изменением кинетических параметров – константы Михаэлиса (K_M) и максимальной скорости каталитической реакции (V_{max}). Облучение разбавленных растворов ведет к увеличению K_M и уменьшению V_{max} как в случае химотрипсина,^{57, 58} так и субтилизина-BPN' (табл. 5).⁵⁴ Поскольку при малых дозах основными нарушениями в сериновых протеиназах являются конформационные, связанные с исчезновением остатков триптофана (по крайней мере, в химотрипсине), и так как в рибонуклеазе, не содержащей остатков триптофана, никаких изменений K_M и V_{max} не происходит,⁵⁹ то модификацию молекул связывают с изменениями в остатках триптофана. К аналогичным выводам на основе облучения химотрипсина и химотрипсиногена пришли авторы работы.⁶⁰ Наличие модифицированных молекул отражается на характере зависимости эффект – доза, в частности, появляются отклонения от экспоненты, и вид кривых зависит от начальной концентрации фермента (рис. 3). В работах^{61–64} для трипсина и химотрипсина наблюдалось

Таблица 5. Изменение кинетических параметров у облученных протеолитических ферментов

Фермент	Условия облучения	Вид излучения	Доза, кГр	Субстрат	Число активных центров	K_M , M	V_{max} , ^c моль · мин ⁻¹ · мг ⁻¹	Ссылки
Субтилизин-72	0.1 M KCl, 30°C, pH 7.5	γ	—	АТЭЭ ^a	1.00	$4.9 \cdot 10^{-2}$	$7.6 \cdot 10^2$	54
	0.1 M KCl, 30°C, pH 7.5	γ	0.95	АТЭЭ	0.86	$5.6 \cdot 10^{-2}$	$7.6 \cdot 10^2$	54
	0.1 M KCl, 30°C, pH 7.5	γ	1.66	АТЭЭ	0.77	$6.1 \cdot 10^{-2}$	$6.6 \cdot 10^2$	54
Субтилизин-BPN'	0.1 M KCl, 30°C, pH 7.5	γ	—	БТЭЭ ^b	1.00	$1.03 \cdot 10^{-2}$	$3.46 \cdot 10^2$	54
	0.1 M KCl, 30°C, pH 7.5	γ	1.2	БТЭЭ	0.83	$1.01 \cdot 10^{-2}$	$2.66 \cdot 10^2$	54
	0.1 M KCl, 30°C, pH 7.5	γ	1.66	БТЭЭ	0.77	$1.01 \cdot 10^{-2}$	$2.08 \cdot 10^2$	54
α -Химотрипсин	H ₂ O, 0°C, pH 5.0, 60 мг/мл	X	—	АТЭЭ	—	$3.5 \cdot 10^{-3}$	100%	57
	H ₂ O, 0°C, pH 5.0, 60 мг/мл	X	0.05	АТЭЭ	—	$5.2 \cdot 10^{-3}$	83%	57
	H ₂ O, 0°C, pH 5.0, 60 мг/мл	X	—	АТЭЭ	—	$2.8 \cdot 10^{-3}$	100%	57
	H ₂ O, 0°C, pH 5.0, 60 мг/мл	X	0.5	АТЭЭ	—	$5.4 \cdot 10^{-3}$	77%	57
	H ₂ O, 0°C, pH 5.0, 60 мг/мл	X	0.75	АТЭЭ	—	$6.9 \cdot 10^{-3}$	66%	57

^a АТЭЭ – этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина.

^b БТЭЭ – этиловый эфир N-бензоил-L-тирозина.

^c V_{max} для α -химотрипсина дана в % от V_{max} необлученного фермента.

Таблица 6. Изменение каталитической активности сериновых протеиназ в водных растворах в зависимости от условий облучения

Фермент	Условия облучения	$t, ^\circ\text{C}$	Вид облучения	Мощность дозы, Гр/с	[E], М	Субстрат	Доза, Гр	$G_{\text{ин}}$	$G_{\text{конф}}$	Остаточная активность фермента, %	Ссылки
Трипсин	$3 \cdot 10^{-3}$ М H_2SO_4	2	X	0.075	$4 \cdot 10^{-3}$	Гемоглобин	25.2	—	—	0	64
	$3 \cdot 10^{-3}$ М H_2SO_4	25	X	0.075	$4 \cdot 10^{-3}$	Гемоглобин	25.2	—	—	49	64
	$3 \cdot 10^{-3}$ М H_2SO_4	37	X	0.075	$4 \cdot 10^{-3}$	Гемоглобин	25.2	—	—	29	64
	$5 \cdot 10^{-3}$ М HCl , рН 3.0, воздух	20	X	0.075	$2 \cdot 10^{-4}$	Гемоглобин	—	1.22 М/1000р	—	—	63
	$5 \cdot 10^{-3}$ М HCl , рН 3.0, воздух	20	X	0.075	10^{-7}	Гемоглобин	—	0.057 М/1000р	—	—	63
	H_2O , воздух	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	86	62
	10^{-3} М фосфатный буфер, рН 6.1	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	83	62
	10^{-2} М фосфатный буфер, рН 6.1	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	80	62
	10^{-1} М фосфатный буфер, рН 6.1	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	69	62
	$2.5 \cdot 10^{-3}$ М ацетатный буфер, рН 4.1	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	50	62
	$5 \cdot 10^{-2}$ М ацетатный буфер, рН 4.1	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	15	62
	10^{-3} М универсальный буфер, рН 5.3	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	5	62
	$5 \cdot 10^{-3}$ М универсальный буфер, рН 5.3	20	X	0.075	10^{-3}	Гемоглобин	100	—	—	4	62
	HCl , рН 3.0, воздух	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбо-бензокси- <i>L</i> -тирозина	—	17.5	—	—	65
	HCl , рН 3.0, N_2	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбо-бензокси- <i>L</i> -тирозина	—	8.8	—	—	65
	HCl , рН 3.0, воздух	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбо-бензокси- <i>L</i> -лейцина	—	8.3	—	—	65
	HCl , рН 3.0, воздух	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	БТЭЭ	—	21.8	—	—	65
	HCl , рН 3.0, N_2	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	БТЭЭ	—	8.2	—	—	65
	HCl , рН 3.0, воздух	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	Метилловый эфир <i>n</i> -толуолсульфонил- <i>L</i> -аргинина	—	22.2	—	—	65
	HCl , рН 3.0, N_2	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	Метилловый эфир <i>n</i> -толуолсульфонил- <i>L</i> -аргинина	—	8.3	—	—	65
	HCl , рН 3.0, воздух	20	X	0.095	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитроанилид гидро-хлорида бензоил- <i>D,L</i> -аргинина	—	18.2	—	—	65

Таблица 6 (продолжение)

Фермент	Условия облучения	t, °C	Вид облучения	Мощность дозы, Гр/с	[E], М	Субстрат	Доза, Гр	G _{ин}	G _{коэф}	Остаточная активность фермента, %	Ссылки
Трипсин	HCl, рН 3.0, воздух	20	X	0.095	5 · 10 ⁻⁶	n-Нитроанилид гидрохлорида бензоил-D,L-аргинина	—	8.0	—	—	65
	HCl, рН 3.0, воздух	20	X	0.095	5 · 10 ⁻⁶	β-Нафтиламид гидрохлорида бензоил-D,L-аргинина	—	10.3	—	—	65
	HCl, рН 3.0, N ₂	20	X	0.095	5 · 10 ⁻⁶	β-Нафтиламид гидрохлорида бензоил-D,L-аргинина	—	5.8	—	—	65
	HCl, рН 3.0, воздух	20	X	0.095	5 · 10 ⁻⁶	Бычий сывороточный альбумин	—	13.1	—	—	65
	HCl, рН 3.0, N ₂	20	γ	0.095	5 · 10 ⁻⁶	Бычий сывороточный альбумин	—	6.0	—	—	65
	HCl, рН 3.0, воздух	20	γ	0.43	2 · 10 ⁻⁵ ÷ 4 · 10 ⁻⁴	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	0.37	—	49
Химотрипсин	N ₂ O, рН 6.6, воздух	20	γ	0.43	2 · 10 ⁻⁵ ÷ 4 · 10 ⁻⁴	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	0.32	—	49
	Глициновый буфер, рН 6.9, воздух	20	γ	0.43	2 · 10 ⁻⁵ ÷ 4 · 10 ⁻⁴	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	0.26	—	49
	Фосфатный буфер, рН 6.9	20	γ	0.43	2 · 10 ⁻⁵ ÷ 4 · 10 ⁻⁴	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	0.36	—	49
	3 · 10 ⁻³ M H ₂ SO ₄ , воздух	20	X	0.075	2.8 · 10 ⁻⁴	Гемоглобин	25.2	—	0.87 M/1000 P	—	61
	3 · 10 ⁻³ M H ₂ SO ₄ , воздух	20	X	0.075	6.4 · 10 ⁻⁶	Гемоглобин	25.2	—	0.5 M/1000 P	—	61
	HCl, рН 3.0, воздух	37	X	17	2 · 10 ⁻⁴	Казеин	—	1.8 · 10 ⁴	—	—	60
	HCl, рН 3.0, N ₂	37	X	17	2 · 10 ⁻⁴	Казеин	—	9.5 · 10 ³	—	—	60
	HCl, рН 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P _x) 0.095 (P _γ)	5 · 10 ⁻⁶	АТЭЭ	—	150	—	—	50
	HCl, рН 3.0, воздух	20	цб γ	0.1 (P _x) 0.095 (P _γ)	5 · 10 ⁻⁶	БТЭЭ	—	170	—	—	50
	HCl, рН 3.0, N ₂	20	X, γ	0.1 (P _x) 0.095 (P _γ)	5 · 10 ⁻⁶	БТЭЭ	—	117	—	—	50
	HCl, рН 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P _x) 0.095 (P _γ)	5 · 10 ⁻⁶	Метиловый эфир N-ацетил-L-тирозина	—	155	—	—	50
	HCl, рН 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P _x) 0.095 (P _γ)	5 · 10 ⁻⁶	Этиловый эфир L-тиروزина	—	136	—	—	50

Таблица 6 (продолжение)

Фермент	Условия облучения	$t, ^\circ\text{C}$	Вид облучения	Мощность дозы, Гр/с	[E], М	Субстрат	Доза, Гр	D_{37}	$G_{\text{ин}}$	$G_{\text{конф}}$	Остаточная активность фермента, %	Ссылки
Химотрипсин	HCl, pH 3.0, N ₂	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	Этиловый эфир <i>L</i> -тирозина	—	99	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбобензокси- <i>L</i> -тирозина	—	140	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, N ₂	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбобензокси- <i>L</i> -тирозина	—	68	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбобензокси- <i>L</i> -лейцина	—	171	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, N ₂	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбобензокси- <i>L</i> -лейцина	—	84	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбобензокси- <i>L</i> -триптофана	—	140	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, N ₂	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	<i>n</i> -Нитрофениловый эфир <i>N</i> -карбобензокси- <i>L</i> -триптофана	—	76	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	Глутарил- <i>L</i> -фенилаланин β -нафтиламид	—	105	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, N ₂	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	Глутарил- <i>L</i> -фенилаланин β -нафтиламид	—	54	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, воздух	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	Глутарил- <i>L</i> -фенилаланин <i>n</i> -нитроанилид	—	147	—	—	—	50
	HCl, pH 3.0, N ₂	20	X, γ	0.1 (P_X) 0.095 (P_γ)	$5 \cdot 10^{-6}$	Глутарил- <i>L</i> -фенилаланин <i>n</i> -нитроанилид	—	76	—	—	—	50
	10 ⁻³ М фосфатный буфер, pH 7, воздух	20	γ	0.12	$1.6 \cdot 10^{-6}$	АТЭЭ	—	45.9	0.265	—	—	45
	10 ⁻³ М фосфатный буфер, pH 7, аргон	20	γ	0.12	$1.6 \cdot 10^{-6}$	АТЭЭ	—	20	0.61	—	—	45
	10 ⁻³ М фосфатный буфер, pH 7, N ₂ O	20	γ	0.12	$1.6 \cdot 10^{-6}$	АТЭЭ	—	14.5	0.83	—	—	45
	HCl, pH 3.0, воздух	20	γ	0.43	$2 \cdot 10^{-5} \div 4 \cdot 10^{-4}$	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	—	0.43	—	66
	H ₂ O, pH 6.2, воздух	20	γ	0.43	$2 \cdot 10^{-5} \div 4 \cdot 10^{-4}$	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	—	0.31	—	66

Таблица 6 (окончание)

Фермент	Условия облучения	$t, ^\circ\text{C}$	Вид облучения	Мощность дозы, Гр/с	$[E], \text{M}$	Субстрат	Доза, Гр	$G_{\text{ли}}$	$G_{\text{конф}}$	Остаточная активность фермента, %	Ссылки
Химотрипсин	Глициновый буфер, pH 6.9	20	γ	0.43	$2 \cdot 10^{-5} \div 4 \cdot 10^{-4}$	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	0.18	—	66
	Фосфатный буфер, pH 6.9	20	γ	0.43	$2 \cdot 10^{-5} \div 4 \cdot 10^{-4}$	Флуоресценция остатков триптофанов	—	—	0.30	—	66
	Фосфатный буфер, pH 6.9	20	X	—	$1.6 \cdot 10^{-5}$	Казеин	40	—	—	—	65
	Фосфатный буфер, pH 6.9	20	X	—	$8 \cdot 10^{-5}$	Казеин	50	—	—	—	65
	Фосфатный буфер, pH 6.9	20	X	—	$1.6 \cdot 10^{-5}$	АТЭЭ	20	—	—	—	65
	Фосфатный буфер, pH 6.9	20	X	—	$8 \cdot 10^{-5}$	АТЭЭ	40	—	—	—	65
Субтилизин-BPN'	Трис-HCl буфер, pH 7.8, воздух	20	γ	0.058	10^{-5}	АТЭЭ	—	0.44	—	—	67
	Трис-HCl буфер, pH 7.8, воздух	20	γ, n	$0.55 \cdot 10^{-4}$	10^{-5}	АТЭЭ	—	0.40	—	—	67
	H ₂ O, pH 6, воздух	2	γ	0.125	$0.42 \cdot 10^{-4}$	АТЭЭ	550	—	—	76	53
	H ₂ O, pH 6, воздух	2	γ	0.125	$0.42 \cdot 10^{-4}$	АТЭЭ	550	—	—	84	53
Субтилизин-72	H ₂ O, pH 6, воздух	2	γ	0.125	$0.42 \cdot 10^{-4}$	АТЭЭ	550	—	—	98	53
	0.1 M NaCl, pH 5.5, воздух	20	γ	0.083	10^{-4}	АТЭЭ	—	0.17	—	—	68
	$5 \cdot 10^{-3}$ M ацетатный буфер, pH 5, воздух	20	γ	0.083	10^{-4}	АТЭЭ	—	0.15	—	—	68
	$5 \cdot 10^{-3}$ M ацетатный буфер, pH 5, воздух	20	γ	0.083	10^{-5}	АТЭЭ	—	0.06	—	—	68
	$5 \cdot 10^{-3}$ M ацетатный буфер, pH 5, воздух	20	γ	0.083	$5 \cdot 10^{-6}$	АТЭЭ	—	0.05	—	—	68
	$5 \cdot 10^{-3}$ M ацетатный буфер, pH 5, воздух	20	γ	0.083	$1 \cdot 10^{-6}$	АТЭЭ	—	0.01	—	—	68
Карбоксипептидаза А	0.1 M NaCl, pH 5.5, воздух	20	γ	0.083	$1 \cdot 10^{-5}$	АТЭЭ	—	0.12	—	—	68
	0.1 M NaCl, pH 5.5, воздух	20	γ	0.083	$5 \cdot 10^{-6}$	АТЭЭ	—	0.10	—	—	68
	0.1 M NaCl, pH 5.5, воздух	20	γ	0.083	$1 \cdot 10^{-6}$	АТЭЭ	—	0.09	—	—	68
	N ₂	20	γ	—	—	Гемоглобин	—	0.27	—	—	69
	N ₂ O	20	γ	—	—	Гемоглобин	—	0.44	—	—	69
	O ₂	20	γ	—	—	Гемоглобин	—	0.26	—	—	69
	N ₂ O + <i>t</i> -BuOH	20	γ	—	—	Гемоглобин	—	0.11	—	—	69

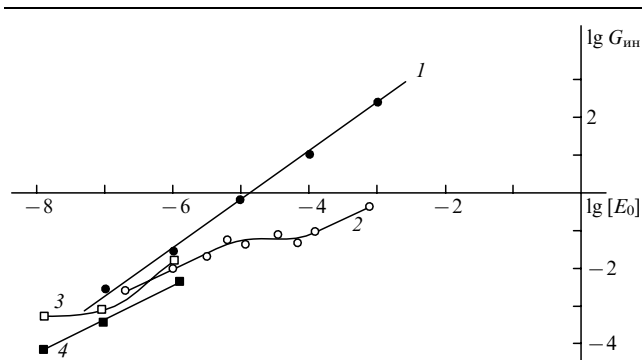


Рис. 4. Зависимость радиационно-химического выхода инактивации ($G_{ин}$) от начальной концентрации химотрипсина (1, 2) и ангиотензин-превращающего фермента (3, 4). Для кривой 1 расчет $G_{ин}$ проводился на начальном участке дозовой зависимости, для кривой 2 — при дозе 200 Гр; 1, 2 — pH 7.8; 3 — pH 7.5; 4 — pH 9.0

изменение радиационно-химического выхода инактивации в зависимости от начальной концентрации фермента $[E_0]$ (табл. 6). Эта зависимость описывалась уравнением $G_{ин} \sim [E]^N$, где N — целое число. Однако концентрационная зависимость отсутствует, если активные радикалы, в данном случае ОН-радикалы, реагируют с растворенными молекулами фермента быстрее, чем друг с другом, поэтому решающим фактором является отношение числа растворенных молекул к числу активных радикалов. Для трипсина, химотрипсина и субтилизина-72 определены области концентраций, при которых зависимости от дозы следуют экспоненциальному закону:³³ $3 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$ М для химотрипсина, $2 \cdot 10^{-6} - 10^{-4}$ М для субтилизина-72 и выше 10^{-6} М — для трипсина. При меньших концентрациях наблюдается отклонение в сторону увеличения инактивации, а при больших (для химотрипсина $> 10^{-4}$ М), наоборот, с увеличением дозы имеет место уменьшение инактивации по сравнению с ожидаемым. Простейший расчет соотношения активных радикалов из воды и молекул фермента для дозы 20 Гр показал взаимосвязь наблюдаемых отклонений с избытком либо радикалов ОН ($< 10^{-6}$ М), либо молекул фермента ($> 10^{-5}$ М). При этом чистота фермента, а также возможная иммобилизация на стекле, хотя и могут изменять абсолютную величину $G_{ин}$, но на характер дозовой зависимости не влияют. Кривая зависимости $G_{ин}$ от начальной концентрации фермента в логарифмических координатах представлена на рис. 4. Для малых доз она линейна, но уже для дозы 0.2 кГр имеет плато в области концентраций химотрипсина $5 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4}$ М. Поэтому авторы предлагают различать две области инактивации, связанные с рассмотренным ранее соотношением: 1) число инактивированных молекул пропорционально начальной концентрации фермента (для химотрипсина доза < 20 кГр), т.е. инактивации подвергается определенная доля молекул; 2) число инактивированных молекул перестает зависеть от начальной концентрации. Исключение могут составлять очень малые концентрации фермента ($< 10^{-7}$ М), при которых слишком высок избыток радикалов, и концентрации выше 10^{-3} М, когда в силу агрегации могут приобретать значение прямое действие излучения и процесс передачи энергии.

Большое влияние на значение величины $G_{ин}$ и вид зависимостей эффект — доза оказывает метод определения ферментативной активности. Автор⁶⁵ указывает на отсутствие экспоненциальной дозовой зависимости в случае трипсина, если каталитическая активность определялась с помощью казеина, и дает объяснение, основанное на методических особенностях определения, а именно, на различиях в ско-

ростях триптического и химотриптического переваривания образующихся пептидов.⁷¹ Смесь пептидов менялась в зависимости от степени облучения и имела различную растворимость в трихлоруксусной кислоте, которая используется в этом методе. Как уже указывалось выше, имеются отклонения в экспоненциальной зависимости и в случае использования эфирных субстратов, в частности этилового эфира N-ацетил-L-тирозина (АТЭЭ).^{33, 65, 71} Причина и степень этих различий изучалась во многих работах, посвященных химотрипсину,^{33, 60, 65, 71, 72} трипсину,⁶⁵ субтилизину-ВРN' (см.⁵³), в основном, на примере казеина и АТЭЭ (табл. 6). В порядке увеличения чувствительности субстраты можно расположить так: казеин $\ll$ БТЭЭ $<$ АТЭЭ. Этот факт служит подтверждением конформационных изменений при облучении. Благодаря разнице в величине биомолекул малейшее конформационное изменение будет сказываться на способности молекул ферментов связывать разные субстраты. Кроме того, казеин, по-видимому, имеет в силу своего строения несколько центров связывания с ферментом, в то время как у эфиров он единственный. Разница в специфичности эфирных субстратов может объясняться различными механизмами связывания.⁵³ Так, в работе⁷² использовали девять эфирных субстратов и показали, что для некоторых из них существует зависимость между потерей каталитической активности и разрушением остатков триптофана, однако данный факт справедлив не для всех субстратов. При этом обе каталитические стадии — как ацилирование активного центра, так и деацилирование, подвержены воздействию ионизирующего излучения.

Следует отметить, что во всех случаях большое значение для радиационной чувствительности имеет чистота фермента и субстрата; особо это показано на примере казеина.⁶⁵

Условия проведения реакции, т.е. состав среды, изменяют радиационно-химический выход активных радикалов и сильно влияют на значение величины $G_{ин}$. Влияние на нее различных буферов приведено в табл. 6, а для субтилизина-72 описано в работе,⁶⁸ в которой сравниваются концентрационные зависимости $G_{ин}$ от начальной концентрации фермента в ацетатном буфере и растворе 0.1 М NaCl. При большой концентрации фермента (10^{-4} М) разница незначительна, однако уже в 10^{-6} М растворе она увеличивается почти на порядок. Наибольшее действие ацетатного буфера на трипсин наблюдали авторы работы.⁶² В то же время трис-HCl буфер практически не влиял на величину $G_{ин}$ химотрипсина.⁵¹

Важное значение при облучении имеет присутствие в растворе ионов Ca^{2+} . Есть сведения о связывании их с молекулами ферментов (в частности, субтилизинами), за счет чего наблюдается защитный эффект, и $G_{ин}$ уменьшается для сериновых протеиназ в результате уменьшения $G_{разв}$. Показано,⁵¹ что присутствие Ca^{2+} замедляет разложение остатков триптофана. Стабилизирующее действие Ca^{2+} известно и при термоинактивации.⁷³ По данным авторов работ^{51, 68} стабилизирующий эффект возрастает с увеличением концентрации фермента; D_{50} (доза, при которой остается 50% активного фермента) повышается в 2 раза. Стабильность увеличивается и с ростом pH до 7.8 (D_{50} увеличивается в 1.5 раза для концентрации 10^{-6} М и в 3 раза для 10^{-4} М). Для субтилизина-72 было исследовано совместное влияние ионов кальция и ацетатного буфера.⁶⁸ В этом случае наблюдаются конкурентные процессы, и протекторное действие ионов Ca^{2+} проявляется тогда, когда эффект связывания молекул субтилизина с ними начинает превышать дестабилизирующее действие увеличения ионной силы раствора. Существует область взаимной нейтрализации эффектов (в данном случае при концентрации фермента около $3 \cdot 10^{-6}$ М).

Таблица 7. Зависимость константы инактивации ($k_{\text{ин,эфф}}$) от вида излучения⁶⁷

Фермент	Среда	pH	Вид излучения	$k_{\text{ин,эфф}} \cdot 10^4$, мин ⁻¹
Химотрипсин, 10 ⁻⁵ М	Трис-HCl буфер	7.8	γ	1.0
	Трис-HCl буфер	7.8	γ -п ^a	0.5
Субтилизин-72, 10 ⁻⁶ М	0.1 М NaCl	5.5	γ	0.9
	0.1 М NaCl	5.5	γ -п ^a	0.5

^a Гамма-нейтронное поле.

Изменение инактивации химотрипсина и субтилизина в зависимости от вида облучения описано в работах^{59,67} и представлено в табл. 7. Однако следует учитывать, что такое изменение, как правило, зависит от мощности дозы источника, что также влияет на радиационную стабильность ферментов.

Много вопросов связано с влиянием кислорода на процесс радиационной инактивации. Сравнение результатов облучения сериновых протеиназ на воздухе и в атмосфере инертного газа проводили в работах^{50,60} выводы их неоднозначны. Считается,⁶⁵ что при облучении на воздухе главная роль принадлежит ОН-радикалам, а в анаэробных условиях — ОН и Н. По данным работы⁷⁴ величины $G(-\text{SH})$ и $G(-\text{Tgr})$ меньше в анаэробных условиях, а у химотрипсина наблюдалась большая чувствительность в отсутствии кислорода.⁵⁷ Одним из объяснений такого рода изменений может служить зависимость от среды облучения (те же конкурентные процессы взаимодействия фермента с активными радикалами и радикалов между собой). Так, ионы O_2^- образуются при pH 5.0 быстрее, чем Н-атомы, а эффективность инактивации для них гораздо меньше.⁵⁷ Протекторная роль кислорода при облучении на воздухе наблюдалась авторами работы.⁷² В ряде случаев определяющим является образование H_2O_2 . Это было показано на примере субтилизина-*Carlsberg*.⁵⁵

Все рассмотренные выше данные относятся к изучению ферментов *in vitro*. Другим вариантом изучения изменения функции фермента под действием ионизирующего излучения являются исследования *in vivo*. Такого рода работы^{75,76} посвящены определению изменения фибринолитического обмена, связанного с активностью плазмينا. Было показано, что фибринолитическая активность уменьшается с увеличением дозы γ -облучения *in vivo*, а это в свою очередь связано с уменьшением реакционной способности активатора плазминогена. К сожалению, данных по механизму радиолиза самих ферментов тромбина и плазмينا в литературе найти не удалось, но можно предполагать, что он единый для сериновых протеиназ и заключается в изменении конформации активного центра.

2. Сульфгидрильные протеиназы

Протеиназы, содержащие в активном центре цистеин, представляют особый интерес при изучении их радиочувствительности в связи с существованием гипотезы единого механизма лучевого поражения, связанного с количеством свободных сульфгидрильных групп в организме.⁷⁷ Детальное рассмотрение радиолиза одной из самых изученных сульфгидрильных протеаз — папаина — провели авторы работ.^{78,79} Как уже указывалось выше, большинство исследований радиолиза ферментов проводили в области экспоненциальной зависимости эффект — доза, которая является, как правило, результатом совокупности нескольких неэкспоненциальных процессов. Авторы работы⁷⁸ описали кинетику инактивации папаина и получили соотношение между дозой и величиной инактивации:

$$D\alpha = \frac{k' - k_1}{k_0} y + \frac{k_1 E_0 + k'_1 F + k_2 P}{k_0} \ln \frac{E_0}{E_0 - y}, \quad (2)$$

где D — доза в рентгенах; α — фактор пропорциональности, превращающий дозу в число радикалов ($It = \alpha D$); I — число радикалов (М/л), образующихся в единицу времени; k' — константа скорости инактивации радикалов активным ферментом; k_1 — константа скорости инактивации радикалов инактивированным ферментом; k_0 — константа скорости инактивации фермента радикалами; E_0 — начальная концентрация фермента; k'_1 — константа скорости инактивации радикалов загрязняющими веществами; F — концентрация загрязняющих фермент веществ; k_2 — константа скорости инактивации радикалов протекторами; y — концентрация инактивированного фермента; P — концентрация радиопротекторов.

Уравнение (2) в принципе применимо к любому ферменту. Оно имеет линейную и логарифмическую компоненты. Только при $k' = k_1$, т.е. если активный и инактивированный фермент одинаково реагируют с радикалами, выполняется экспоненциальная зависимость для кривых доза — эффект, так как тогда

$$E = E_0 \exp(-k_0 D \alpha / [k_1 E_0 + k'_1 F + k_2 P]) = E_0 \exp(-KD). \quad (3)$$

Однако авторы наблюдали, что при экспоненциальной дозовой зависимости Х-инактивации папаина, активные молекулы фермента реагируют с продуктами радиолиза воды быстрее, чем инактивированные. Это заставило их рассмотреть более подробно кинетику инактивации. Было получено семейство кривых с увеличением выхода инактивации в зависимости от дозы, что связано с уменьшением значимости логарифмической части уравнения (2) с возрастанием k_0 . Теоретические представления хорошо согласовались с экспериментальными данными для Х-инактивации $1.2 \cdot 10^{-5}$ М растворов папаина в фосфатном буфере при pH 7.4 и 0°C. В случае, когда $k' \neq k_1$, изменяются параметры радиочувствительности, что обычно приводит к уменьшению инактивации. Авторы работы⁸⁰ считали, что если ферментом является папаин, то в отличие от сериновых протеиназ, он как SH-содержащий фермент предпочтительнее реагирует с акватированным электроном e_{aq}^- . Основным механизмом инактивации является поражение активного центра одним из продуктов радиолиза воды и при этом важна только одна активная группа, взаимодействие радикала с которой приводит к инактивации молекулы, т.е. $(k' - k_1)/k_0 = 1$.

Предположение о том, что механизм инактивации папаина (Pa) сводится к повреждению активного центра подтверждается экспериментами с модифицированным папаином, а также изменением $G_{\text{ин}}$ в присутствии ингибиторов.⁸¹ Когда в качестве модификаторов использовали цистеамин моносульфоксид, который дает смешанный дисульфид Pa-S-S-R , и тетратионат, образующий ион $\text{Pa-S-S}_2\text{O}_3^-$, наблюдалось⁸² увеличение радиационной устойчивости таких производных папаина (табл. 8).

Таким образом, в отличие от сериновых протеиназ, инактивация сульфгидрильных ферментов отчасти сводится к повреждению активного центра, в основном по одноударному механизму, и это обуславливает различие в k' и k_1 и ведет к отклонению дозовой зависимости от экспоненты. Следует также учитывать, что e_{aq}^- могут проходить с большой эффективностью сквозь молекулы белка, и это должно затруднять применение теории мишени при расчетах для SH-ферментов. Однако благодаря заметному электронному сродству дисульфидных мостиков такие оценки все же возможны.⁴⁸ Как уже отмечалось, дозовые кривые для сериновых протеиназ, которые не являются зависимыми от повреждения непосредственно серина в активном центре, тоже не

Таблица 8. Изменение каталитической активности сульфгидрильных протеиназ при действии рентгеновского излучения ($t = 0^\circ\text{C}$), субстрат – гемоглобин

Фермент	Условия облучения	Мощность дозы, Гр/с	Доза, Гр	$[E] \cdot 10^5, \text{M}$	$D_{37}^a, \text{Гр}$	Ионный выход	Кол-во SH-групп на молекулу	$G_{\text{ин}}^a$	Остаточная активность, ^a %	Ссылки
Папаин	0.067 М фосфатный буфер, рН 7.4, воздух	0.14	65	1.35	30 (70)	—	0.5	0 (40)	—	79
	0.067 М фосфатный буфер, рН 7.4, воздух	0.16	—	0.9	—	0.79	0.5	—	—	79
	0.067 М фосфатный буфер, рН 7.4, воздух в присутствии каталазы	0.14	63	1.2	85	0.41	0.5	—	50	79
	0.067 М фосфатный буфер, рН 7.4, N ₂	0.16	—	0.9	—	0.44	—	—	—	79
	0.067 М фосфатный буфер, рН 7.4, N ₂ в присутствии каталазы	0.16	—	0.9	—	0.37	—	—	—	79
	0.067 М фосфатный буфер, рН 7.4	0.145	300	1.5	—	—	—	—	— (27)	48
	Ацетатный буфер, рН 6.8, N ₂ O	$1.5 \cdot 10^{-4}$	—	2.0	—	—	—	1.00 (0.54)	—	79
	Ацетатный буфер, рН 6.9, N ₂ , <i>i</i> -BuOH	$1.5 \cdot 10^{-4}$	—	2.0	—	—	—	1.00 (0.53)	—	85
	рН 6.9	$1.5 \cdot 10^{-4}$	—	2.0	—	—	—	0.43 (0.11)	—	85
	рН 6.9, (CNS) ₂ [—]	$1.5 \cdot 10^{-4}$	—	2.0	—	—	—	1.00 (0.31)	—	85
Папаин-S—S—R	0.067 М фосфатный буфер, рН 7.4	0.145	300	1.5	—	—	0.4	—	— (82)	48

^a В скобках приведено значение в присутствии цистеина.

всегда отвечают экспоненциальной зависимости. Объяснение этих фактов более сложно, поскольку авторы^{78, 79} не учитывали изменений конформации молекулы папаина, считая этот процесс второстепенным. Однако он неизбежно должен происходить в результате образования под действием ионизирующего излучения S—S-связей и смешанных дисульфидов типа Pa—S—S—R, что изменяет (чаще укрепляет) структуру молекулы и тормозит полную деструкцию, влияя на конформацию.

Наблюдаемые конформационные нарушения в папаине происходят, как было показано в работах,^{48, 87} за счет раз-

рушения тирозиновых и триптофановых остатков с преимущественным повреждением тирозинов, из которых два (Туг-61 и Туг-67) находятся вблизи активного центра. Кроме того, большую роль в инактивации папаина играет имидазол-тиольная пара (Cys-25 и His-159), что влияет на взаимодействие фермента с субстратом.⁸⁶ Очевидно, в случае папаина как и для трипсиноподобных ферментов, помимо воздействия e_{aq}^- , важным является атака ОН-радикалов и доступность для них ароматических аминокислотных остатков. В табл. 9 приведены данные по реакционной способности различных аминокислотных остатков в папаине по

Таблица 9. Реакционная способность и доступность некоторых аминокислотных остатков в папаине по отношению к ОН-радикалам⁴⁸

Аминокислотные остатки	$n_{\text{общ}}$	$n_{\text{эсп}}$	$k_{(\text{ОН} + \text{АК})} \cdot 10^{-9}, \text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$	$n_{\text{эсп}} \cdot k_{(\text{ОН} + \text{АК})}$	$\frac{n_{\text{эсп}} \cdot k_{(\text{ОН} + \text{АК})}}{\sum n_{\text{эсп}} \cdot k_{(\text{ОН} + \text{АК})}}$
Цистеин	1	1	12.3	12.3	0.04
Триптофан	5	2.2	13.3	29.3	0.10
Тирозин	19	13	10.1	131.3	0.47
Гистидин	2	2	4.7	9.4	0.03
Фенилаланин	4	2	5.5	11.0	0.04

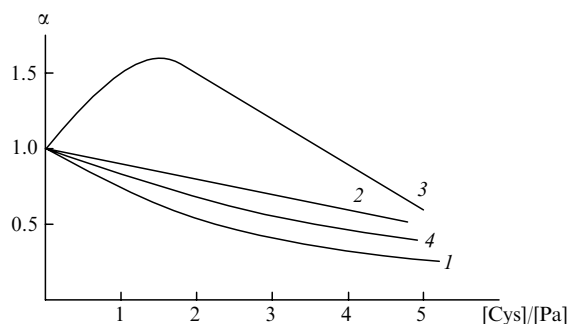
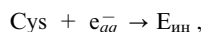


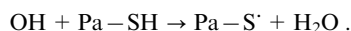
Рис. 5. Относительный выход инактивации (α) в зависимости от $[Cys]/[Pa]$; 1 – вычисленная доля OH-радикалов, реагирующая с папаином в N_2 -насыщенных растворах, 2 – невосстанавливаемая инактивация, 3 – общая инактивация, 4 – доля, соответствующая взаимодействию с папаином общих (OH + e_{aq}⁻) радикалов в N_2 -ыфц-насыщенных растворах

отношению к OH-радикалам. Первенствуют в этом списке остатки тирозина и триптофана. Общие константы скорости реакций папаина с OH-радикалами и e_{aq}⁻ даны в табл. 3.

Таким образом, аддитивность двух процессов:



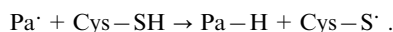
(E_{ак}^{*} – молекулы активных, но поврежденных молекул) создает картину инактивации папаина. При этом падение эстеразной активности папаина, как и для сериновых протеиназ, связано⁴⁸ с деструкцией Trp-177. Кроме того, вклад в инактивацию вносит реакция отрыва H-атома от SH-группы



Если вблизи S–S-мостика находятся ароматические аминокислотные остатки, вероятность инактивации увеличивается за счет суммы процессов. Действие ионизирующего излучения на дисульфиды и тиолы, как известно на примере γ -радиолиза цистеаминдисульфида⁴⁸ и цистина,^{83,84} дает многочисленные продукты, которые затем вступают во вторичные реакции. Аналогичные процессы влияют и на инактивацию SH-ферментов.

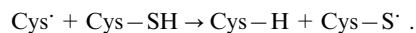
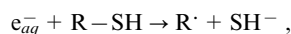
Интересно, что папаин обладает большей радиочувствительностью по сравнению с другими SH-содержащими ферментами, такими, как алкогольдегидрогеназа и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.⁸¹ При этом его способность к реактивации цистеином выше. В то же время ввиду большей уязвимости активного центра по двум рассмотренным выше реакциям, папаин более радиочувствителен и по сравнению с сериновыми протеиназами. Однако следует учитывать специфику и чувствительность методов определения каталитической активности, которые, как было показано на примере химотрипсина, имеют весьма существенное значение. Кроме того, при определении активности папаина и расчета величин $G_{ин}$ надо принимать во внимание, что около 50% папаина в препарате может быть в окисленной (неактивной) форме; это затрудняет сравнение данных из разных работ, если не проводилась предварительная реактивация или очистка.⁸⁵

Эксперименты показали,^{48,80} что радиационная инактивация папаина значительно уменьшается при добавлении цистеина после облучения, отчасти за счет реакции



Отношение $G_{ин}$ (в присутствии цистеина)/ $G_{ин}$ (в отсутствии цистеина) (относительный выход) представлено на рис. 5. При этом защита цистеином зависит от реального соотношения $[Pa]/[Cys]$. Так, в очищенных азотом растворах оно должно составлять 1/(2–10). Это обусловлено, кроме указанной выше реакции, конкурентными процессами с

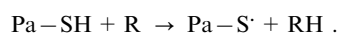
радикалами OH и более быстрыми реакциями с участием e_{aq}⁻



Поэтому e_{aq}⁻ вызывают восстанавливаемую инактивацию, в то время как OH-радикалы – невосстанавливаемую.⁸⁵

Следует отметить, что увеличение pH раствора, как правило, повышает величину $G_{ин}$, хотя взаимосвязь между этими величинами неоднозначна.⁸¹

Изучалось влияние условий облучения на радиационную инактивацию папаина. Авторы⁸⁵ выяснили воздействие на этот процесс ацетатного, изобутанольного и CNS-радикалов. Оказалось, что все они увеличивают величину $G_{ин}$ (табл. 8), очевидно, за счет реакции



Наблюдалось также влияние пероксида водорода на инактивацию папаина.^{79,85,86} Пероксид дает 60% восстанавливаемых и 40% невосстанавливаемых повреждений в папаине.⁸⁵ При этом исключение его влияния путем добавления каталазы уменьшает ионный выход, который практически не изменяется на воздухе и в атмосфере азота. Зависимость инактивации от наличия H_2O_2 можно оценить также по увеличению радиационной инактивации папаина при уменьшении мощности дозы в отсутствие каталазы.

Таким образом, главное отличие в механизмах радиационной инактивации сериновых и сульфгидрильных протеиназ заключается в том, что в последнем случае наблюдается не только нарушение конформации при деструкции ароматических аминокислотных остатков, но и конкурентный преобладающий процесс одноударной инактивации за счет поражения активного центра.

3. Другие классы протеиназ

Если радиолиз сериновых и сульфгидрильных протеиназ изучен достаточно полно, то остальные представители протеиназ упоминаются в литературе от случая к случаю.

В работе⁷⁰ рассмотрен радиолиз пепсина – кислой протеиназы, содержащей остаток аспарагиновой кислоты в активном центре. Было показано, что общие закономерности инактивации для этого фермента те же, что и для трипсина, химотрипсина и субтилизина: в растворе основным реакционным агентом является OH-радикал, весьма эффективен атомарный водород, который, однако, вносит меньший вклад в инактивацию вследствие небольшого выхода. Сходство заключается и в повреждении тех же радиационно-чувствительных аминокислотных остатков: Trp и Tyr, что доказано изменением величины инактивации в присутствии ионов Br₂⁻ и (SCN)₂⁻, а также *трет*-бутанола. Параметры и условия инактивации приведены в табл. 6.

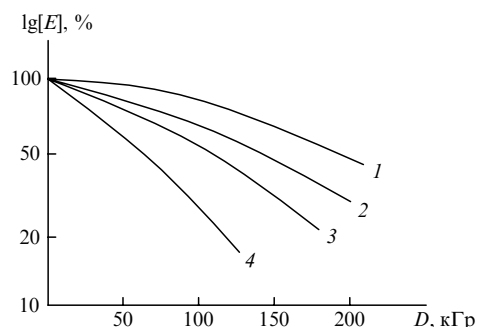


Рис. 6. Изменение радиочувствительности пепсина в зависимости от условий облучения: ⁶⁹ 1 – Ar + *t*-BuOH, 2 – O₂, 3 – Ar, 4 – N₂O

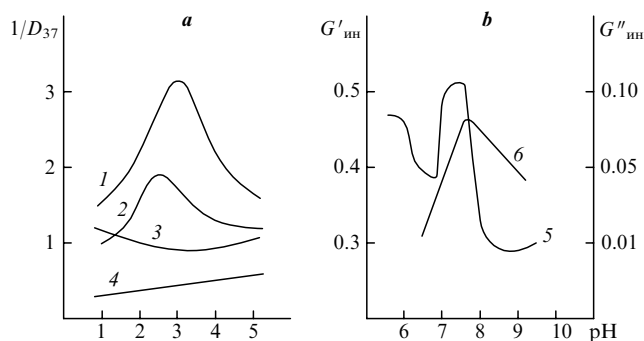


Рис. 7. Изменение радиочувствительности пепсина⁶⁹ (а), субтилизина-72 ($G'_{ин}$, 5, б)⁵² и ангиотензин-превращающего фермента (АПФ, $G''_{ин}$, 6, б) в различных условиях: 1 – $N_2O + KBr$, 2 – N_2O , 3 – O_2 , 4 – $N_2O + KSCN$

На рис. 6 и 7 инактивация пепсина представлена в виде дозовых зависимостей и изменения pH-зависимости в различных условиях облучения. Последняя имеет изменение в области pH 2–3. Учитывая такие же изменения для субтилизина⁵² и ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (рис. 7), можно говорить о том, что радиационная инактивация дает возможность определять условия, при которых осуществляется конформационные изменения в молекуле.

В случае карбоксипептидазы-А эффективность действия продуктов радиолиза воды на ее энзиматическую активность не отличается от таковой для сериновых протеиназ,⁶⁹ несмотря на то, что активный центр в этом случае содержит ион металла (Zn). Наблюдается и близкая величина радиационно-химического выхода инактивации ($G_{ин}$, табл. 6). Все это подтверждает, что инактивация такого класса ферментов происходит в первую очередь посредством нарушения конформации, а не по одноударному механизму поражения активного центра. Значительная зависимость инактивации от конформационного состояния молекулы наблюдалась и на примере Zn-содержащей гидролазы – АПФ, для стабильности которой важное значение имело количество разрушенных ароматических аминокислотных остатков. Разложение их на ~ 50% вызывало доступ радикалов к активному центру и падение ферментативной активности (рис. 8).

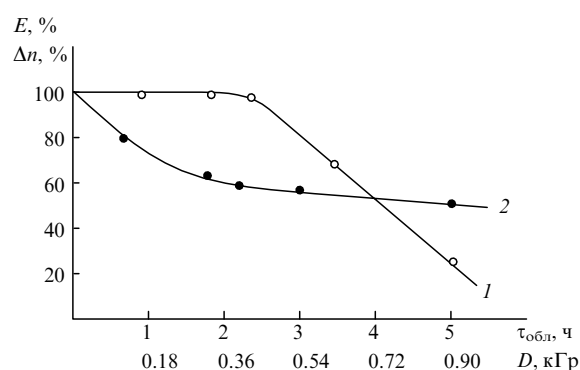


Рис. 8. Изменение каталитической активности (E) (1) и количества остатков триптофана и тирозина Δn (2) в АПФ (γ -облучение)

В целом, процесс радиационной инактивации протеиназ, как впрочем и любого другого фермента, можно представить схемой (рис. 9), использование которой усложняет выражения, полученные авторами работ.^{79, 80} Процесс 4 (рис. 9), который и составляет собственно механизм инактивации, т.е. изменения биомолекулы, зависит от коэффициента эффективности действия продуктов радиолиза воды на данный фермент в виде самого активного центра или его ближайшего окружения. Наибольшим выходом и высокой эффективностью обладают ОН-радикалы и e_{aq}^- . У атомов Н, имеющих максимальную эффективность, выход недостаточно высок, чтобы значительно влиять на инактивацию, поэтому именно ОН и e_{aq}^- вносят основной вклад в данный процесс. При облучении чистого фермента принципиальные различия наблюдаются у SH-содержащих ферментов и остальных протеиназ, независимо от того, находится ли у них в активном центре серин, аспарагиновая кислота или атом металла. Биомолекулы, содержащие SH-группу, помимо конформационных повреждений за счет взаимодействия ОН-радикалов с остатками триптофана и тирозина, подвергаются непосредственному воздействию e_{aq}^- на цистеин в активном центре, что приводит к увеличению для них величины $G_{ин}$. В условиях одинакового механизма инактивации принципиальное значение имеет площадь

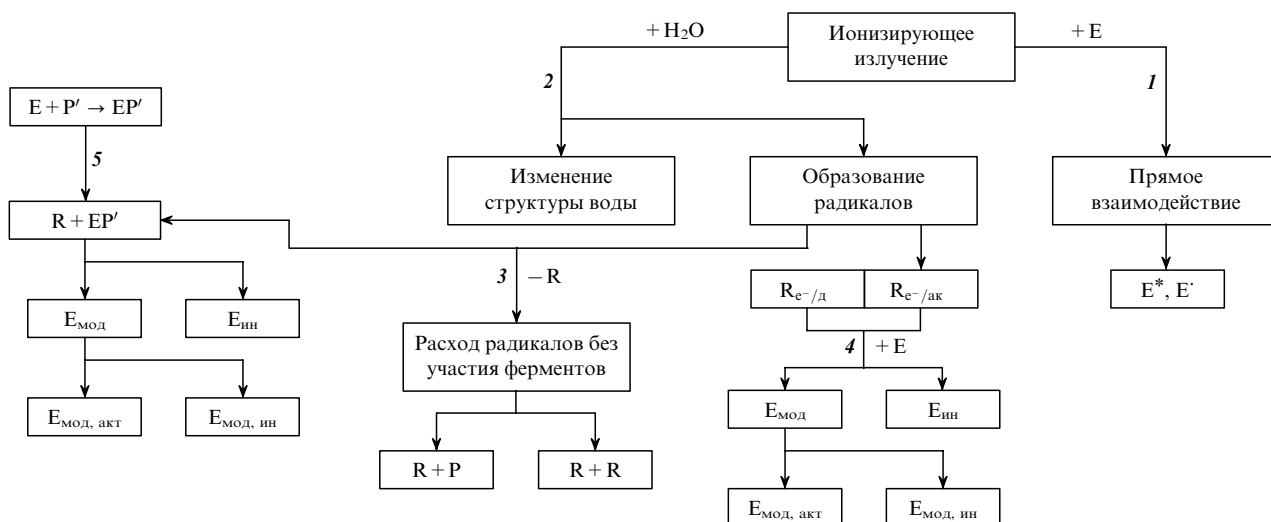


Рис. 9. Схема взаимодействия ферментов с ионизирующим излучением; E – нативный фермент, E^* – радикальные фрагменты молекулы фермента, E' – возбужденные молекулы фермента, $E_{ин}$ – инактивированный фермент, $E_{мод}$ – фермент, любым образом модифицированный, $E_{мод, акт}$ – фермент, модифицированный без изменения активности, $E_{мод, ин}$ – фермент, модифицированный с изменением активности, R – радикалы из воды, $R_{e^-/д}$ – электронодонорные радикалы, $R_{e^-/ак}$ – электроноакцепторные радикалы, P, P' – химические молекулы-примеси, присутствующие в растворе

Таблица 10. Площади доступной поверхности для разных классов протеиназ

Фермент	Площадь доступной поверхности, (Å) ²	Ссылки
Химотрипсин	12996	88
Карбоксипептидаза-А	11260	89
Субтилизин	9790	88
Папаин	9210	88

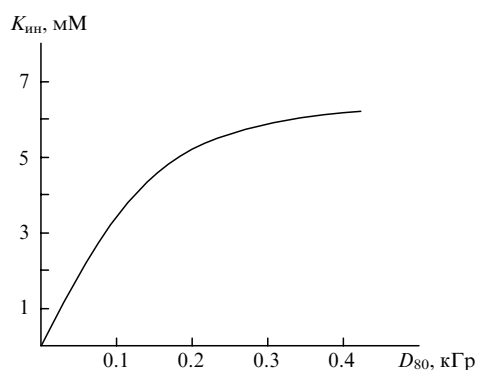
доступной поверхности молекулы, которая характеризует степень ее развернутости. В табл. 10 приведены некоторые значения величин доступной поверхности для металлосодержащих, SH-содержащих и сериновых протеиназ. Сравнение со значениями $G_{ин}$ (табл. 6) показывает, что для химотрипсина и карбоксипептидазы они близки, для субтилизина, имеющего меньшую доступную поверхность, уменьшается и радиационно-химический выход инактивации. Однако для папаина, отличающегося механизмом инактивации, несмотря на меньшую площадь доступной поверхности, наблюдается более высокий $G_{ин}$. Кроме того, для любой протеиназы радиационная стабильность зависит от доступности ароматических аминокислотных остатков, особенно Trp и Tug, независимо от устойчивости активного центра.

IV. Применение метода радиационной инактивации протеолитических ферментов

Метод радиационной инактивации имеет достаточно интересные перспективы в плане применения. Частично об этом говорилось выше.

Наиболее старым и известным применением метода радиационной инактивации является его использование при определении молекулярных масс биомолекул. Особый интерес вызывает возможность характеризовать сложные надмолекулярные образования.¹⁸ Для этой цели метод хорошо разработан и подробно описан;^{5, 17, 18, 23, 35} Он удобен, надежен и достаточно широко применяется.

Весьма перспективным представляется медицинское применение результатов радиационного изучения протеиназ. В этом случае используются иммобилизованные ферменты, которые, как было описано выше, гораздо стабильнее, чем в растворе. Важно, что действие таких материалов на организм пролонгировано и требуются незначительные концентрации ферментов.^{41–43} Описано, в основном, использование сериновых протеиназ, в частности, трипсина. Предварительная радиационная обработка преследует одновременно цели иммобилизации и стерилизации, практически не затрагивая ферментативную активность.

**Рис. 10.** Зависимость константы ингибирования химотрипсина $K_{ин}$ радиомодификаторами от D_{80}

Способы получения полутонковых изображений под действием разных видов радиации на материалах, содержащих протеиназы, открывают широкие возможности для создания дозиметрических систем на их основе.⁴⁰ Чувствительность таких материалов можно повышать (т.е. снижать нижний предел определяемых доз) за счет изменения материала подложки, введения в нее добавок, а также повышения концентрации ферментов (последнее менее желательно из-за значительного удорожания материала и возможности частичного радиолиза). Помимо чисто дозиметрических целей некоторые из рассмотренных систем³⁹ могут служить альтернативным материалом рентгеновским пленкам, использующимся в автордиографии и медицине.

В последние годы в связи с резким ухудшением радиологической обстановки широко разрабатываются различные биохимические модели, дающие возможность оценить степень риска воздействия ионизирующего излучения одновременно с обычными бытовыми и медицинскими факторами (бытовая химия, удобрения, пестициды, лекарства).⁸ Кроме того, эти исследования имеют своей целью и возможность скрининга радиопротекторов. В отличие от испытаний на животных биохимические модели проще и дают дополнительные представления о механизме действия реагента в определенных условиях. Среди разрабатываемых моделей имеются и ферментные, в частности, гидролазные.⁹ Ферментные модели пытались использовать в 50-е годы, однако они оказались неэффективными из-за прямолинейного трактования результатов. Оказалось, что корреляция между действием радиации на организм и ферменты более сложная и связана с влиянием эффекторов (активаторов и ингибиторов), которые под действием ионизирующего излучения или других видов радиации приводят к большей или меньшей разбалансировке систем организма. На рис. 10 изображена корреляция между константой ингибирования ($K_{ин}$) химотрипсина некоторыми известными радиопротекторами и дозовой характеристикой (D_{80}), при которой 80% фермента остается активным. При этом тип ингибирования (конкурентное, бесконкурентное) заметного влияния на данную зависимость не оказывал.⁹⁰ Следует учитывать, что эффектором может являться любое соединение, используемое в повседневной жизни человека, в том числе компоненты пищи, лекарства, парфюмерия и т.д. Таким образом, многие вещества служат радиомодификаторами, изменяя возможное действие любого вида радиации. Использование ферментных моделей может характеризовать влияние радиомодификатора на вполне определенный механизм радиационного воздействия, в частности, протеазная модель дает сведения о конформационном механизме.

Литература

1. И.Я.Василенко, Ю.И.Москалев, В.Н.Стрельцов. *Вопросы онкологии*, **31**, 3 (1985)
2. *Первичные радиобиологические процессы*. (Под ред. Н.Ф.Тимофеева-Ресовского). Атомиздат, Москва, 1973
3. *Радиационное поражение и восстановление структур и функций макромолекул*. (Под ред. А.В.Савича). Медицина, Москва, 1977
4. Н.Ф.Тимофеев-Ресовский, А.В.Савич, М.И.Шальнов. *Введение в молекулярную радиобиологию*. Медицина, Москва, 1981
5. А.Своллоу. *Радиационная химия органических соединений*. Иностран. лит., Москва, 1963
6. М.В.Владимирова. *Радиационная химия актиноидов*. Энергоиздат, Москва, 1983
7. W.M.Garrison. *Chem. Rev.*, **87**, 381 (1987)
8. М.М.Виленьчик. *Радиобиологические эффекты и окружающая среда*. Энергоиздат, Москва, 1983
9. М.А.Орлова, С.Е.Ткаченко, Т.Р.Трофимова, Н.Н.Трошина, В.М.Федосеев, И.В.Голубцов, В.В.Кууск. *Biochem. Biotechnol. Elect. Express Data*, **1**, 15 (1991)
10. J.F.Fowler. *Phys. Med. Biol.*, **29**, 97 (1984)

11. L.Rosenberg, M.Awschalam, R.K.Ten Haben, B.R.Bennett. *Health. Phys.*, **46**, 407 (1984)
12. H.Wakabayashi, Sh.Suzuki, A.Ite. *J. Radiat. Res.*, **24**, 305 (1983)
13. P.Andreo, A.Brahme. *Acta Radiol. Oncol. Rad. Ther. Phys. and Biol.*, **22**, (1983) (Suppl. N 364. P.25)
14. L.Frankenberg. *Radiat. Res.*, **97**, 329 (1984)
15. В.Н.Орехович, Л.А.Локшина, Ю.Е.Елисеева, Л.В.Павлихин. *Вестн. АМН СССР*, **8**, 3 (1984)
16. Н.И.Ларионова. Дис. д-ра хим. наук. МГУ, Москва, 1992
17. E.Pollard, A.Buzzell, C.Jeffrays, F.Forro. *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 9 (1951)
18. J.C.Ellory. *TJBS*, 99 (1979)
19. M.Houslay, J.C.Ellory, G.Smith, T.Hesketh, J.Stein, G.Warren, J.C.Metcalf. *Biochim. Biophys. Acta*, **467**, 208 (1977)
20. P.Simon, S.Swillens, J.Dumont. *Biochem.J.*, **205**, 477, (1982)
21. A.S.Verkmann, K.Skorecki, D.A.Ausiello. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 150 (1984)
22. S.R.Levinson, J.C.Ellory. *Biochem. Acta J.*, **137**, 123 (1974)
23. К.Г.Циммер. *Проблемы количественной радиобиологии*. Госатомиздат, Москва, 1962
24. D.P.Alexander, D.A.Charlesby. *Nature*, **173**, 578 (1954)
25. R.B.Setlow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **38**, 166 (1952)
26. R.B.Setlow, B.Doyle. *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 46 (1953)
27. A.Norman, W.Ginoza. *Radiat. Res.*, **7**, 440 (1957)
28. R.L.Kincald, E.Kempner, V.C.Manganielle, G.C.Osborne, M.Vaughan. *J. Biol. Chem.*, **256**, 11351 (1981)
29. T.B.Nielsen, P.M.Lad, M.S.Preston, E.Kempner, W.Schlegel, M.Rodbell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 722 (1981)
30. E.Kempner, W.Schlegel, J.H.Miller, J.Z.Hearon. *J. Biol. Chem.*, **255**, 6826 (1980)
31. E.Kempner, W.Schlegel. *Anal. Biochem.*, **92**, 2 (1979)
32. А.К.Валеев, О.В.Малиновский. *Радиобиология*, **23**, 624 (1983)
33. М.А.Орлова, И.И.Никольская, И.В.Голубцов. *Радиобиология*, **27**, 308 (1987)
34. R.A.Deering. *Radiat. Res.*, **5**, 238 (1956)
35. E.S.Pollard, W.R.Guld, F.Hutchinson, R.B.Setlow. *Prog. Biophys.*, **5**, 238 (1955)
36. T.K.Hopkins, J.D.Spikes. *Radiat. Res.*, **37**, 253 (1969)
37. P.Riesz, F.H.White. *Radiat. Res.*, **44**, 24 (1970)
38. F.H.White, P.Riesz, H.Kon. *Radiat. Res.*, **32**, 744 (1962)
39. Е.В.Лукашева, Н.Ф.Казанская, И.В.Березин. *Вестн. МГУ. Химия*, **27**, 86 (1986)
40. М.А.Орлова, И.И.Никольская, И.В.Голубцов, Н.Ф.Казанская. *Radiat. Eff. Lett.*, **85**, 143 (1984)
41. Р.В.Вирник, В.В.Рыльцев, Л.Г.Власов, Е.В.Довбий, А.Т.Калашник. *Прикл. биохим. микробиол.*, **19**, 533 (1983)
42. В.В.Рыльцев, Л.Г.Власов, Т.И.Самойлова, Л.И.Волковинская, Л.Н.Бондарева, В.Д.Зажирей, С.В.Нетребенко, В.И.Хачиянц. *Прикл. биохим. микробиол.*, **20**, 694 (1984)
43. Р.В.Вирник, В.В.Рыльцев, Л.Г.Власов, Г.И.Самойлова, Е.В.Довбий, А.Т.Калашник. *Прикл. биохим. микробиол.*, **21**, 106 (1985)
44. L.Schachinger, Ch.Schippel, E.Altmann, B.Diepold, Ch.Yang, M.Jaenke. *Radiat. Environ. Biophys.*, **24**, 259 (1985)
45. G.E.Adams, K.F.Baverstock, R.B.Cundall, J.L.Redpath. *Radiat. Res.*, **54**, 375 (1973)
46. K.R.Lynn, G.Orpen. *Int. J. Radiat. Biol.*, **14**, 363 (1968)
47. J.R.Clement, D.A.Armstrong, N.A.Gillis. *Can. J. Chem.*, **50**, 2833 (1972)
48. J.R.Clement, D.A.Armstrong, H.N.V.Klassen. *Can. J. Chem.*, **51**, 2443 (1973)
49. A.G.Bezrukova, J.Yu.Ostashevsky. *Int. J. Radiat. Biol.*, **31**, 131 (1977)
50. K.R.Lynn, G.Orpen. *Radiat. Res.*, **39**, 15 (1969)
51. И.И.Никольская, М.А.Орлова, И.В.Голубцов. *Радиобиология*, **26**, 302 (1986)
52. И.И.Никольская, М.А.Орлова, Е.В.Богаевская. *Радиобиология*, **26**, 477 (1986)
53. K.Otsuki, M.Fukuhara, K.Sumizu, H.Hatano. *J. Radiat. Res.*, **11**, 113 (1970)
54. K.Otsuki. *J. Radiat. Res.*, **11**, 120 (1970)
55. C.E.Stauffer, D.Etson. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5333 (1969)
56. R.A.Alden, C.S.Wright, F.C.Westall, J.Kraut. *Subtilisin BPN': Tertiary Structure and Inhibitor Binding*. 1970
57. L.K.Mee. *Radiat. Res.*, **21**, 501 (1964)
58. L.K.Mee. *Radiat. Res.*, **9**, 151 (1958)
59. T.W.Smith, S.J.Adelstein. *Radiat. Res.*, **19**, 213 (1963)
60. L.A.Mounter. *Radiat. Res.*, **12**, 487 (1960)
61. E.C.Moore, M.McDonald. *Radiat. Res.*, **3**, 38 (1955)
62. M.McDonald. *J. Gen. Physiol.*, **38**, 581 (1955)
63. M.McDonald. *J. Gen. Physiol.*, **38**, 93 (1955)
64. M.McDonald. *Brit. J. Radiol.*, **27**, 62 (1954)
65. K.R.Lynn. *Radiat. Res.*, **46**, 268 (1971)
66. A.G.Bezrukova, I.Yu.Ostashevsky. *Int. J. Radiat. Biol.*, **31**, 349 (1977)
67. М.А.Орлова, И.В.Голубцов, И.И.Никольская. *Вестн. МГУ. Химия*, **28**, 601 (1987)
68. М.А.Орлова, И.И.Никольская, Е.В.Богаевская, И.В.Голубцов. *Радиобиология*, **26**, 844 (1986)
69. P.B.Roberts. *Int. J. Radiat. Biol.*, **24**, 143 (1973)
70. G.E.Adams, M.I.Pesener, R.H.Bisby, R.B.Cundall, J.R.Key. *Int. J. Radiat. Biol.*, **35**, 497 (1979)
71. D.Aronson, L.Mee, C.L.Smith. In *Progress in Radiobiology. Proc. of IV Int. Conf. on Radiobiol. Held. Cambridge, 1955*. P.61
72. K.R.Lynn. *Radiat. Res.*, **43**, 525 (1970)
73. В.В.Мосолов. *Протеолитические ферменты*. Наука, Москва, 1971
74. T.Masuda, J.Ovadia, L.L.Grossweiner. *Int. J. Radiat. Biol.*, **20**, 447 (1971)
75. Ch.Ts'ao, W.F.Ward. *Radiat. Res.*, **101**, 394 (1985)
76. Ch.Ts'ao, W.F.Ward, C.D.Port. *Radiat. Res.*, **96**, 301 (1983)
77. Э.Я.Граевский. *Сульфгидрильные группы и радиочувствительность*. Атомиздат. Москва, 1969
78. T.Sanner, A.Phihl. *Radiat. Res.*, **19**, 12 (1963)
79. A.Phihl, T.Sanner. *Radiat. Res.*, **19**, 27 (1963)
80. G.M.Gaucher, B.L.Mainman, G.P.Thompson, D.A.Armstrong. *Radiat. Res.*, **46**, 457 (1971)
81. S.Fuimoto, T.Nakagawa, S.Ishimitsu, A.Ohara. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 992 (1983)
82. J.W.Purdie. *Can. J. Chem.*, **49**, 725 (1971)
83. J.W.Purdie. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 226 (1967)
84. D.W.Grant, S.N.Mason, M.A.Link. *Nature*, **192**, 352 (1961)
85. G.M.Gaucher, D.A.Armstrong. *Can. J. Chem.*, **51**, 2443 (1973)
86. W.S.Lin, G.Maurice, M.Lal, D.A.Armstrong. *Can. J. Chem.*, **54**, 242 (1976)
87. G.Beguta, A.M.Dancewicz. *Int. J. Radiat. Biol.*, **43**, 249 (1983)
88. C.Chetskia. *Nature*, **254**, 304 (1975)
89. C.Chetskia. *J. Mol. Biol.*, **105**, 1 (1976)
90. М.А.Орлова, С.Е.Ткаченко, Т.П.Трофимова, Н.Н.Трошина, В.М.Федосеев. *Вестн. МГУ. Химия*, **34**, 1993. В печати

RADIATION INACTIVATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES

M.A.Orlova

Chemistry Department, M.V.Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 119899 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095) 939-0126

The survey was devoted to generalisation of protease inactivation mechanism for different conditions of irradiation and for different kinds of enzymes. The importance of radiation conformation changes and the possible use of radiolytic processes were considered especially. The serine-, SH-, acidic- and metal-contained enzymes were described. Bibliography – 90 references.

Received February 4, 1993