

УДК 577.34:541.147

О МЕХАНИЗМЕ ФОТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К МОЛЕКУЛАМ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

© 2001 г. В.Г. Артюхов, Н.В. Агишева, М.А. Наквасина

Воронежский государственный университет

Исследованы структурно-функциональные свойства изоформ лактатдегидрогеназы, модифицированной воздействием УФ- и видимого излучений в свободном состоянии и в присутствии некоторых биогенных аминов. Выявлено, что фотопротекторное действие серотонина по отношению к функциональным свойствам ЛДГ, по всей вероятности, обусловлено образованием комплекса белок-индолилалкиламин, более фоторезистентного, чем свободный фермент; в основе защитного эффекта гистамина лежит способность его молекул акцептировать активные формы кислорода (в частности, $^1\text{O}_2$ и $\text{OH}\cdot$), а протекторное действие дофамина и адреналина связано как с образованием комплекса белок-биогенный амин, так и с дезактивацией АФК.

ВВЕДЕНИЕ

Возросший в последние годы интерес исследователей к изучению молекулярных механизмов биологического действия биогенных аминов (рис. 1) связан не только с их функцией нейромедиаторов, но и метаболитов, контролирующими важные внутриклеточные процессы. Наиболее полно изучен в этом плане серотонин: в клетке он существенно влияет на превращение углеводов по гликолитическому и пентозофосфатному путям, процессы окислительного фосфорилирования, степень восстановления пиридиновых коферментов, активность АТФаз и другие процессы. Серотонин может вызывать изменения проницаемости плазматических мембран нервных и гладкомышечных клеток для Ca^{2+} (универсального вторичного мессенджера), усиливать его поступление в цитоплазму и стимулировать высвобождение из внутриклеточных депо [1]. Изменение уровня и метаболизма 5-окситриптамина в организме человека играет важную роль в развитии некоторых патологических состояний: лучевой болезни, злокачественного роста клеток, аллергических, инфекционных, нервнопсихических и других заболеваний. Таким образом, серотонин способен модулировать регуляторные эффекты других биологически активных химических соединений и физических факторов.

Установлено, что биогенные амины проявляют радиозащитный эффект по отношению к биосистемам различного уровня организации. Однако вопрос о механизме их протекторного действия является дискуссионным: с одной стороны, имеются данные о фармакологическом (гипоксическом) механизме

защитного эффекта серотонина при введении его в организм животных [2], а с другой, обосновывается концепция о “нефармакологическом”, клеточном механизме радиозащитного действия биогенных аминов [3, 4]. Протекторный эффект серотонина по отношению к молекулам некоторых ферментов (лактатдегидрогеназы, каталазы) связывают с возможностью образования комплекса между ионами металлов этих белков и индолилалкиламином [5, 6], а также со способностью серотонина проявлять антиоксидантные свойства и перехватывать свободные радикалы, образующиеся в биосистемах под влиянием ионизирующего излучения [1, 2].

В последние годы было выявлено, что избыточная продукция или медленная утилизация некоторых аминокислот (в частности, глутаминовой и аспарагиновой), играющих роль возбуждающих медиаторов в нейронах, приводит к нейротоксическим эффектам. Эти соединения были названы эксайтотоксическими аминокислотами. Их токсическое действие связано

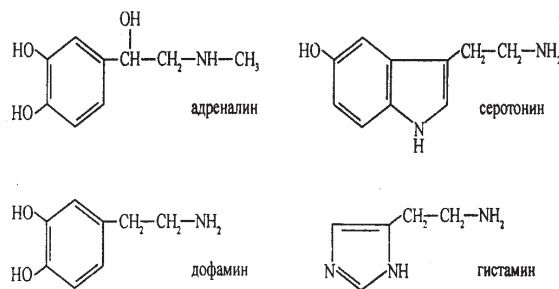


Рис. 1. Структурные формулы биогенных аминов

со стимуляцией активных форм кислорода (АФК), вызывающих окислительное повреждение тканей [7]. К эксайтотоксическим соединениям относят и дофамин, нарушение обмена которого обуславливает усиление нейродегенеративных процессов в организме. Показано, что ДОФА и дофамин могут спонтанно окисляться с образованием семихинона и супероксидного анион-радикала кислорода.

На основании анализа результатов исследования УФ-индуцированных изменений структурно-функциональных свойств изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из различных источников (сердечная и скелетная мышцы свиньи, эритроциты человека) в присутствии химических соединений (азидата натрия, β -каротина, D-маннита, гистидина, серотонина, аскорбата, урата, NADH, нитросинего тетразолиевого), способных взаимодействовать с АФК и проявляющих в определенных концентрациях фотопротекторное действие по отношению к молекулам этого белка, выявлена важная роль синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, супероксидного анион-радикала и радикала гидроксила в процессе фотомодификации изоформ ЛДГ [8]. При изучении сенсibilизированного метиленовым голубым фотоокисления молекул фермента показана возможность окисления ЛДГ синглетным кислородом в условиях его экзогенной генерации.

Учитывая вышеизложенное, а также тот факт, что активные кислородные метаболиты (АКМ) играют существенную роль в реализации различных радиобиологических и фотоиндуцированных процессов, нами были исследованы структурно-функциональные свойства изоформ ЛДГ, модифицированной воздействием УФ- и видимого излучений в свободном состоянии и в присутствии некоторых биогенных аминов.

МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовали изоферменты (H_4 , H_3M , H_2M_2) ЛДГ, выделенные из эритроцитов человека методами ионообменной и вытеснительной аффинной хроматографии, а также изоформу M_4 из скелетных мышц свиньи, полученную обессоливанием коммерческого препарата фермента ("Reanal", Венгрия). Степень гомогенности полученных препаратов ЛДГ и ее изоферментные спектры исследовали методом диск-электрофореза в ПААГ с последующим выявлением фракций белка специальной красящей смесью [9, 10]. Электрофореграммы изонизмов ЛДГ получали денситометрированием гелей на денситометре MD-100 ("Carl Ceiss", Германия).

Ферментативную активность ЛДГ регистрировали на спектрофотометре СФ-46 при 340 нм по реакции окисления NADH и выражали в микромолях пре-ращенного NADH в 1 мин [11].

УФ-облучение исследуемых образцов проводили при их непрерывном перемешивании с помощью магнитной мешалки в термостатируемой кювете (20 ± 1 °C) светом ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400. Расстояние от оси лампы до кюветы с образцом составляло 23 см. Облучение осуществляли через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм (интенсивность излучения – $0,15$ кДж/м² в мин).

Фотосенсibilизированное окисление ЛДГ проводили в цилиндрическом стеклянном сосуде диаметром 2 см при постоянном перемешивании. Объем исследуемого образца – 2 мл. Источником света служило устройство для локального облучения красным светом "Улокс", изготовленное по лазерной технологии на основе трехкомпонентного твердого раствора гелия, мышьяка и алюминия (Воронежский филиал государственной научно-производственной фирмы "Микротек"). Длина волны максимума излучения – 665 ± 15 нм; выходная интенсивность излучения – 20 Вт/см². Источник света располагался на расстоянии 3 см от образца. В качестве фотосенсibilизатора применяли раствор тиазинового красителя метиленового голубого (МГ).

В экспериментах использовали также растворы серотонина, гистамина ("Sigma", США), дофамина, адреналина ("Chromo-log согр.", США).

Регистрацию ИК-спектров осуществляли на спектрофотометре "Specord-M80" ("Carl Ceiss", Германия) в диапазоне $1800-400$ см⁻¹. Интервал между точками измерения – 4 см⁻¹, время интегрирования измерения каждой точки – 3 с. Расчет интенсивности абсорбции проводили с использованием метода базовых линий [12].

Антирадикальную активность биогенных аминов исследовали по интенсивности люминолзависимой хемиллюминесценции на биолюминометре БХЛ-06 М в системах с экзогенной генерацией активных форм кислорода: радикалов гидроксила – в системе Фентона, синглетного кислорода – при облучении системы красным светом в присутствии МГ.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили на ПЭВМ типа IBM PC/AT с помощью пакета прикладных статистических программ "Statgraphics".

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2, а показаны результаты исследования уровня функциональной активности ЛДГ эритроцитов (изоферменты H_4 , H_3M , H_2M_2) крови человека после воздействия УФ-излучения в дозах $1,5+4,5$ кДж/м² на молекулы фермента в свободном состоянии и в присутствии адреналина. Из анализа этого рисунка следует, что каталитическая активность интактного ферментного

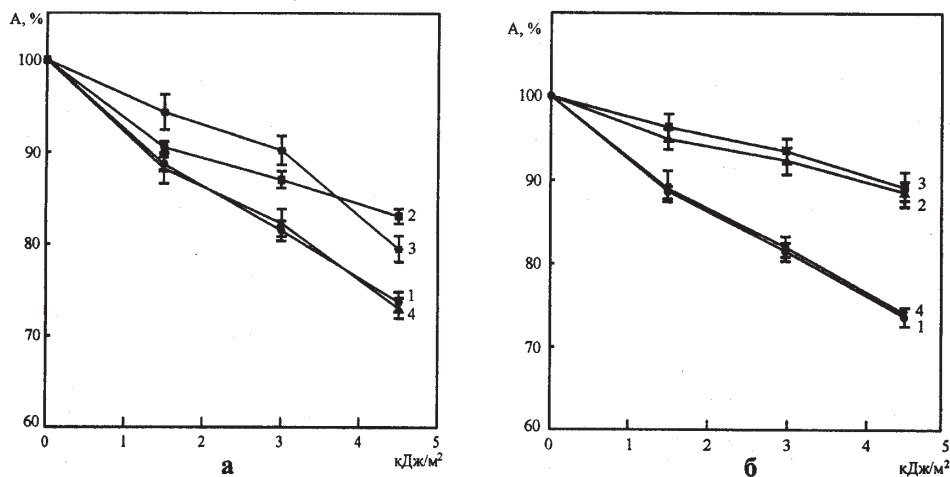


Рис. 2. Зависимость величин каталитической активности лактатдегидрогеназы эритроцитов человека в свободном состоянии и в присутствии некоторых биогенных аминов от дозы облучения:

а – в присутствии адреналина; б – серотонина.

Обозначения кривых: 1 – УФ-облучение без модификатора;

УФ-облучение в присутствии биогенных аминов в концентрациях: 2 – 10^{-6} моль/л; 3 – 10^{-7} моль/л; 4 – 10^{-8} моль/л

препарата при действии УФ-света (кривая 1) падает с ростом дозы облучения, что обусловлено поглощением энергии квантов УФ-излучения остатками ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и фенилаланина), входящих в состав молекулы ЛДГ [8]. Предварительная инкубация раствора фермента с адреналином ($2 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-7}$ моль/л) индуцирует статистически достоверное повышение уровня активности УФ-облучаемой ЛДГ (кривые 2 и 3 соответственно) по сравнению с исследуемым параметром при воздействии УФ-света на свободный белок. Адреналин в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ моль/л (кривая 4) не проявляет защитное действие по отношению к функциональной активности фермента.

Аналогичные результаты были получены нами и при использовании в качестве модифицирующего агента серотонина (рис. 2, б). Выраженный фотопротекторный эффект зарегистрирован в случае применения индоллилалкиламина в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-7}$ моль/л (кривые 2 и 3).

При исследовании уровня функциональной активности ЛДГ эритроцитов после УФ-облучения в свободном состоянии и в присутствии дофамина (рис. 3, а) установлено, что последний проявляет защитное действие во всем использованном диапазоне его концентраций. Причем максимальный фотопротекторный эффект катехоламина обнаруживается при его концентрации $2 \cdot 10^{-7}$ моль/л, а менее выраженный – при $2 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Гистамин выступает в качестве эффективного фотопротектора по отношению к молекулам фермен-

тного препарата из эритроцитов человека только в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л (рис. 3, б).

При исследовании уровня функциональной активности ЛДГ из скелетных мышц свиньи (изофермент M_d), УФ-модифицированной в присутствии изучаемых биогенных соединений в концентрациях, при которых выявляется наиболее выраженный фотозащитный эффект по отношению к эритроцитарному ферменту, также зарегистрирован протекторный эффект этих агентов во всем использованном диапазоне доз УФ-света (табл.).

По-видимому, протекторный эффект биогенных аминов по отношению к молекулам различных изоферментов ЛДГ при воздействии УФ-излучения может быть обусловлен образованием комплекса белок-модификатор, более фоторезистентного, чем свободный фермент, а также дезактивацией этими соединениями активных форм кислорода.

Следует отметить, что многие биогенные амины способны формировать комплексы с белками, ионами металлов, АТФ. Белки составляют основу рецепторов регуляторных веществ аминокислотного происхождения. При этом связывание нейромедиаторов в центре узнавания рецепторов обусловлено образованием совокупности связей или взаимодействий (водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий) с одним или несколькими аминокислотными остатками: наиболее вероятными “партнерами” для катехоламинов являются остатки тирозина и фенилаланина, триптофан – для серотонина, гистидин – для гистамина.

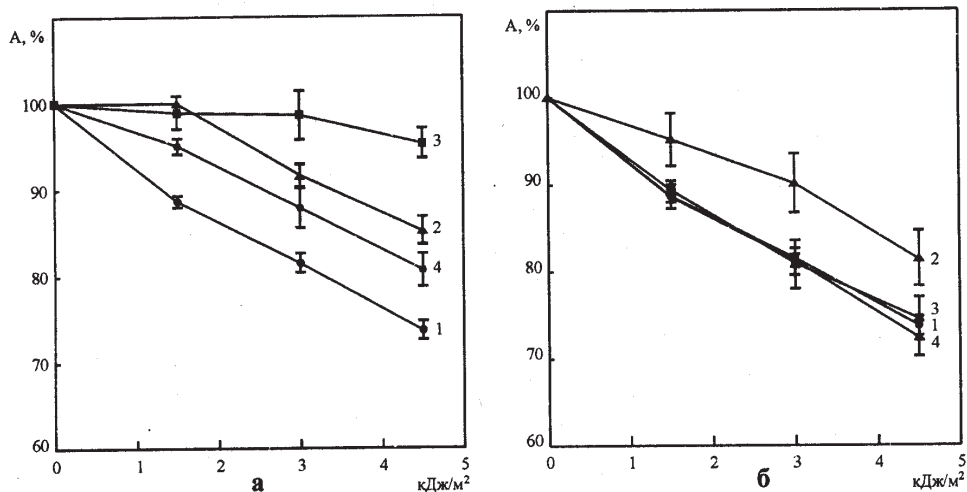


Рис. 3. Зависимость величин каталитической активности лактатдеhydroгеназы эритроцитов человека в свободном состоянии и в присутствии некоторых биогенных аминов от дозы облучения:

а – в присутствии дофамина; **б** – гистамина.

Обозначения кривых: 1 – УФ-облучение без модификатора;

УФ-облучение в присутствии биогенных аминов в концентрациях: 2 – 10^{-6} моль/л; 3 – 10^{-7} моль/л; 4 – 10^{-8} моль/л

По всей вероятности, способностью исследуемых биогенных аминов вступать во взаимодействие с аминокислотными остатками белков обусловлен эффект ингибирования ими каталитической активности интактной ЛДГ, усиливающийся с ростом концентрации этих агентов. Наиболее выраженным ингибирующим действием на молекулы эритроцитарной ЛДГ обладают адреналин и дофамин в концентрациях $2 \cdot 10^{-3}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, наименее выраженным – гистамин. Все биогенные амины не влияют на уровень активности нативного фермента в диапазоне концентраций $2 \cdot 10^{-6}$ – $2 \cdot 10^{-8}$ моль/л, которые и были использованы в экспериментах по УФ-облучению исследуемых образцов ЛДГ.

Одним из наиболее высокочувствительных методов анализа изменений структурного состояния молекул биополимеров под влиянием различных физико-

химических факторов является регистрация их спектральных характеристик в инфракрасной (ИК) области спектра. Поэтому с целью детализации представлений, касающихся выяснения механизма защитного действия биогенных аминов по отношению к молекулам ЛДГ, были изучены особенности вторичной структуры изофермента M_4 в нативном состоянии и в присутствии исследуемых экзогенных соединений.

Спектр поглощения аминокислот и пептидов в твердом состоянии характеризуется наличием сильных полос в области $3000-3500 \text{ см}^{-1}$ и около 1600 и 1400 см^{-1} , что обусловлено ионным дипольным состоянием молекулы: в высокочастотной области – валентными колебаниями NH-группы, а полосы 1600 и 1400 см^{-1} соответствуют двум основным колебаниям карбоксильной группы – COO-. По мере удлинения полипептидной

Таблица.

УФ-индуцированные изменения функциональной активности (в процентах) лактатдеhydroгеназы мышечного типа в свободном состоянии и в присутствии некоторых биогенных аминов

Образец	Доза облучения, кДж/м ²				
	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
нативный фермент	85,9±0,7	76,0±2,3	67,1±1,9	57,7±2,3	50,2±1,8
+ адреналин (1:1)	89,0±0,4*	79,0±0,6*	71,2±1,4*	64,6±1,9*	57,6±1,3*
+ дофамин (1:1)	89,2±1,2	81,6±1,0*	73,5±1,7*	66,4±0,4*	57,4±0,8*
+ гистамин (10:1)	87,9±0,3*	79,4±0,3*	72,3±0,7*	64,3±1,3*	57,7±1,2*
+ серотонин (1:1)	88,9±0,9*	79,9±2,1	72,9±0,7*	65,9±1,2*	57,3±0,4*

Примечание: в скобках указаны соотношения молярных концентраций биогенного амина и белка; * - отличие от контроля (нативный фермент) статистически достоверно.

цепи проявление концевых групп становится менее заметным (хотя возможно обнаружение ионизированных групп боковых цепей аминокислотных остатков), зато отчетливо наблюдается сильное поглощение пептидной (амидной) группы. В большинстве белков и полипептидов эта группа имеет транс-конформацию. Валентные колебания NH связи дают сильную полосу около 3300 см^{-1} . В области ниже 2000 см^{-1} выделяются несколько полос, обозначаемых “Амид I” (около 1650 см^{-1}), “Амид II” (около 1550 см^{-1}) и “Амид III” (около $1200-1300\text{ см}^{-1}$), обусловленных колебаниями в плоскости, и широкая полоса поглощения неплоских деформационных колебаний NH (“Амид V”). Все перечисленные колебания являются достаточно характеристическими и практически не зависят от природы боковых цепей [13].

Анализ соотношения интенсивности поглощения в полосах Амид I и Амид II на частотах, являющихся характеристическими для отдельных элементов вторичной структуры (то есть α -спирали, β -складок и беспорядочных компонентов белковой глобулы) [14], свидетельствует о том, что присутствие биогенных аминов – адреналина, дофамина и серотонина – индуцирует незначительное увеличение доли беспорядочной структуры в молекуле фермента. При этом снижается общая интенсивность поглощения в полосе Амид II для смеси белок+модификатор в случае использования адреналина и дофамина в различных соотношениях.

Изменение спектральных характеристик фермента удается обнаружить и на других участках спектра. Так, при соотношении молекул лактатдегидрогеназы и дофамина 1:1 и 1:10 уменьшается интенсивность поглощения образцов на частотах 1465, 1445, 685, 670 см^{-1} по сравнению с контролем (нативным белком). В то же время полосы поглощения на 1010 и 620 см^{-1} становятся более интенсивными.

Определенный интерес вызывает участок $1300-1050\text{ см}^{-1}$. Если в спектре свободной лактатдегидрогеназы на нем отмечаются два выраженных пика с максимумами, приходящимися на ~ 1240 и $1160-1120\text{ см}^{-1}$, то в присутствии модификатора (дофамина) пик только один: $1160-1120\text{ см}^{-1}$, а общая интенсивность полосы поглощения заметно выше.

В опытах *in vitro* с гемоглобином и лактатдегидрогеназой эритроцитов человека было доказано существование межмолекулярного комплекса белок-серотонин, формирование которого затрагивает не только высшие типы пространственной организации белков, но и элементы его вторичной структуры [15, 16].

Присутствие гистамина не оказывает влияния на ИК-спектральные характеристики изофермента ЛДГ.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют сделать заключение о возможности форми-

рования макромолекулярных комплексов лактатдегидрогеназа-биогенный амин при использовании адреналина, дофамина и серотонина.

Отсутствие изменений спектральных свойств ЛДГ в присутствии гистамина в ИК-области спектра послужило стимулом для изучения возможной антирадикальной активности этого соединения.

Известно, что аминокислоты и белки являются самыми сильными тушителями $^1\text{O}_2$: наиболее активны в этом отношении триптофан, гистидин, метионин и цистеин (константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ в D_2O соответственно равны $(3,2 - 5,6) \cdot 10^7$; $(4 - 4,6) \cdot 10^7$; $(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$; $(0,9 - 5) \cdot 10^7$ моль $^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Тирозин и фенилаланин $((2-5) \cdot 10^6$ и $7 \cdot 10^5$ моль $^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) на порядок слабее [17]. Вклад химического тушения, приводящего к существенным изменениям в структуре и активности белков и аминокислот, может составлять от 10 до 100%. Физическое тушение $^1\text{O}_2$ аминокислотами и белками определяется в основном образованием комплексов с переносом заряда между $^1\text{O}_2$ и тушителями [18]. Следует подчеркнуть, что исследуемые биогенные амины являются производными аминокислот, выступающими акцепторами $^1\text{O}_2$. Так, основным путем биосинтеза катехоламинов (дофамина и адреналина) считается их образование из фенилаланина через тирозин и ДОФА. Серотонин и гистамин синтезируются соответственно путем ферментативных превращений триптофана и гистидина. Кроме того, нами установлено, что гистидин ($1,5 \cdot 10^{-3} \div 1,5 \cdot 10^{-1}$ моль/л) проявляет фотопротекторный эффект по отношению к функциональной активности изоферментов ЛДГ из эритроцитов человека при УФ-облучении в дозе $1,5\text{ кДж/м}^2$.

В связи с вышеизложенным следующим этапом исследований, направленных на выяснение механизмов фотопротекторного эффекта биогенных аминов по отношению к молекулам ЛДГ (изофермент M_d), явилось изучение фотоиндуцированных изменений ее ферментативной активности при воздействии видимого света ($\lambda_{\text{max}} = 665 \pm 15\text{ нм}$) в присутствии метиленового голубого (МГ), т. е. в условиях экзогенной сенсibilизированной генерации $^1\text{O}_2$.

Облучение ЛДГ красным светом в течение 15 мин. в присутствии МГ в концентрациях $2 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л сопровождается эффектом сенсibilизации: каталитическая активность фермента снижается на 25 и 14% соответственно (рис. 4). Использование эффективных тушителей $^1\text{O}_2$ показало, что в этих условиях фотоинактивация фермента идет с участием синглетного кислорода [8].

При введении в облучаемую систему гистамина ($2 \cdot 10^{-7}$ моль/л) отмечается статистически достоверное восстановление уровня функциональной активности ЛДГ: остаточная активность белка при концентрации МГ

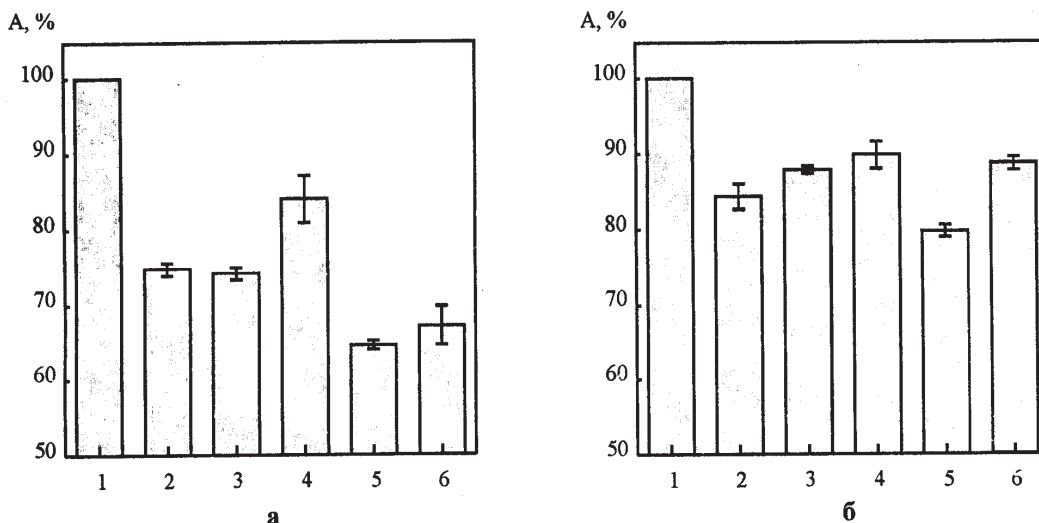


Рис. 4. Величина каталитической активности ЛДГ ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л), облученной красным светом в присутствии метиленового голубого (МГ) и некоторых биогенных аминов.

а – концентрация МГ $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л; б – концентрация МГ $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Обозначения: 1 – контроль (нативный фермент + МГ); облучение видимым светом в присутствии МГ: 2 – нативного фермента; 3 – + серотонин ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л); 4 – + гистамин ($2 \cdot 10^{-7}$ моль/л); 5 – + дофамин ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л); 6 – + адреналин ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л)

$2 \cdot 10^{-5}$ моль/л составляет $85,9 \pm 2,4\%$, а для концентрации красителя $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л – $89,9 \pm 3,0\%$ (рис. 4, а и б). Эти данные свидетельствуют в пользу представлений о способности гистамина конкурировать с молекулами ЛДГ за взаимодействие со свободными радикалами и, в частности, 1O_2 , что обуславливает фотопротекторное действие этого соединения. Акцептором АФК, по-видимому, является имидазольное кольцо гистамина.

Адреналин и дофамин ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) усиливают повреждающее действие МГ ($2 \cdot 10^{-5}$ моль/л), вызывая дополнительную инактивацию фермента на 7,7 и 11% соответственно. Эти соединения способны эффективно окисляться в условиях экзогенной генерации АФК с образованием высокореакционноспособных радикальных продуктов, повреждающих белковую глобулу. Так, регистрация спектров хемилюминесценции продуктов перекисления дофамина и адреналина позволила идентифицировать отдельные полосы как принадлежащие димерам 1O_2 [19].

При облучении фермента в присутствии МГ в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л и дофамина ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) также наблюдается сенсibilизирующий эффект: величина остаточной каталитической активности ЛДГ составляет $79,5 \pm 1,2\%$ (рис. 4, б). Адреналин в аналогичных условиях облучения выступает в качестве защитного агента: обнаруживается статистически достоверное повышение активности фермента на 5,5% по сравнению с таковой при облучении свободного белка.

При добавлении в облучаемую систему серотонина ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) при концентрации МГ $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л (рис. 4, б) величина регистрируемой каталитической активности фермента статистически достоверно не отличается от уровня исследуемого показателя для фотомодифицированной свободной ЛДГ (рис. 4, а). В случае снижения концентрации красителя на порядок наблюдается незначительное, но в то же время статистически достоверное повышение функциональной активности изофермента M_4 белка по отношению к таковому для контрольного образца ($83,8 \pm 1,7\%$).

По-видимому, возможность проявления исследуемых биогенными соединениями фотопротекторного эффекта по отношению к ЛДГ в условиях фотосенсибилизированной генерации 1O_2 зависит от целого ряда факторов: способности дезактивировать синглетный кислород и окисляться с образованием как короткоживущих высокореакционноспособных соединений радикальной природы, так и стабильных малоактивных продуктов окисления, а также стационарной концентрации 1O_2 , продуцируемого МГ в триплетном возбужденном состоянии. Кроме того, фотоинактивация ЛДГ при облучении видимым светом может быть индуцирована и комплексированием красителя с поверхностными участками белковой глобулы, что благоприятствует протеканию реакций по типу I, а именно, непосредственному химическому взаимодействию триплетных состояний сенсibilизатора с аминокислотными остатками фермента. Вероятно, модуляция

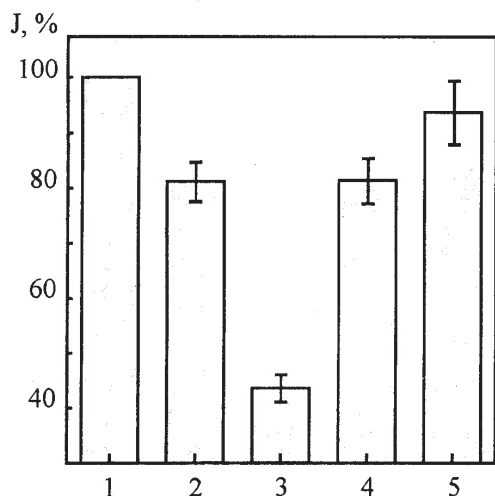


Рис. 5. Величина интенсивности (J) люминолзависимой хемиллюминесценции в системе генерации ОН-радикалов (реакция Фентона) в присутствии некоторых биогенных аминов. Обозначения: 1 – контроль; 2 – + дофамин (10^{-3} моль/л); 3 – + адреналин (10^{-3} моль/л); 4 – + гистамин (10^{-3} моль/л); 5 – + серотонин (10^{-3} моль/л)

фоточувствительности ЛДГ в данном случае реализуется не только посредством взаимодействия модификатора с АФК, но и другими путями, в частности, за счет образования комплекса белок-биогенный амин, в результате которого отдельные участки молекулы ЛДГ могут становиться недоступными для связывания МГ.

Нами показано, что в условиях химической генерации ОН-радикала по механизму Фентона дофамин, гистамин и серотонин не оказывают влияние на уровень функциональной активности модифицированной ЛДГ, а адреналин вызывает сенсibiliзирующий эффект действия гидроксилирующего агента на молекулы белка.

При исследовании хемиллюминесценции химической системы генерации радикала гидроксила в присутствии люминола и исследуемых биогенных аминов выявлено статистически достоверное снижение интенсивности люминолзависимой хемиллюминесценции, что свидетельствует о возможности окисления молекул дофамина и гистамина ОН-радикалами с образованием окисленных продуктов типа окси- и гидроксидофамина и адренохрома (рис. 5).

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что фотопротекторное действие серотонина по отношению к функциональным свойствам изоформ ЛДГ, по всей вероятности, обусловлено образованием комплекса белок-индолилалкиламин, более фоторезистентного, чем свободный фермент. По-видимому, в основе защитного эффекта гистамина лежит способность его молекул акцептировать АФК (в частности, $^1\text{O}_2$

и ОН), а протекторное действие дофамина и адреналина связано как с образованием комплекса белок-биогенный амин, так и дезактивацией АФК. В последнем случае результирующий эффект (уровень остаточной активности ЛДГ) и вклад того или иного пути защиты белка будут зависеть от спектрального состава излучения, присутствия фотосенсибилизаторов, преимущественной продукции в исследуемой системе активного кислородного метаболита, его стационарной концентрации, концентрации белка и фотопротектора.

На основании выдвинутой нами ранее схемы [8] фотохимических превращений ЛДГ, приводящих к инактивации ее молекул, которая учитывает вклад в эти процессы не только $^1\text{O}_2$ и ОН-радикалов, но и супероксидного анион-радикала и H_2O_2 , представляется необходимым проведение следующего этапа работы, касающегося выявления участия биогенных аминов в процессах дезактивации этих АФК в условиях экзогенной генерации, что позволит получить наиболее полную информацию о молекулярных механизмах фото- и радиопротекторного эффектов этих соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курский М.Д., Бакшеев Н.С. Биохимические основы механизма действия серотонина. Киев. Наукова думка. 1974. 296 с.
2. Бак З. Химическая защита от ионизирующей радиации. М. Мир. 1968. 263 с.
3. Гончаренко Е.Н., Кудряшов Ю.Б. // Радиобиология. 1973. Т. 13. Вып. 6. С. 811-812.
4. Гончаренко Е.Н. // Биол. науки. 1978. №7. С. 7-16.
5. Lohmann W., Moss A.J., Garland W.B. et al. // Experimentia. 1966. V. 22. Fsc. 8. P. 514-515.
6. Lohmann W., Moss A.J., Sanders J.L. et al. // Radiat. Res. 1966. V. 29. № 2. P. 155-165.
7. Болдырев А.А. Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине. М. Издво МГУ. 1998. 320 с.
8. Артюхов В.Г., Наквасина М.А., Лысенко Ю.А., Агишева Н.В. // Укр. биохим. журн. 2001. Т. 72. № 1. С. 29-42.
9. Маурер Г. Диск-электрофорез. М. Мир. 1971. 248 с.
10. Гааль Э., Медьешин Г., Верецкей Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М. Мир. 1982. 446 с.
11. Bergmeyer H. Methods of enzymatic analysis. New York – London. 1965. 300 p.
12. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. М. Мир. 1989. 608 с.
13. Чиргадзе Ю.Н. // Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М. Наука. 1967. С.132.

О МЕХАНИЗМЕ ФОТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К МОЛЕКУЛАМ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

14. Калоус В., Павличек З. Биофизическая химия. М. Мир. 1985. 446 с.
15. Артюхов В.Г., Вашанов Г.А., Лавриненко И.А. // Вестник ВГУ. Сер. 2. Естеств. науки. 1996. № 2. С. 3-10.
16. Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Агишева Н.В. // Радиц. биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 6. С. 693-700.
17. Красновский А.А., мл. // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. № 5. С. 530-548.
18. Красновский А.А., мл. // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. М. Наука. 1988. С. 23-41.
19. Kruk I., Lichszeld K., Michalska T. et al. // Z. Naturforsch. 1989. V. 44. № 11-12. P.895-900.