

УДК 577.112.4

**КРАТКОСРОЧНОЕ ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ГИДРОФОБНЫХ
АГЕНТОВ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ
ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

Гидулянов А.А.

*Крымский агротехнологический университет, Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: sgaa@mail.ru*

Изучено влияние хлороформа и бензола на электрофоретическую подвижность фракций гемоглобина. Получены данные, свидетельствующие об изменении электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием исследуемых углеводов.

Ключевые слова: гемоглобин, хлороформ, бензол, электрофоретическая подвижность.

ВВЕДЕНИЕ

Воздействие комплекса химических веществ в концентрациях, наиболее часто встречающихся в реальных условиях, в большинстве случаев вызывает неспецифические реакции организма разной степени выраженности, которые зависят от морфофункционального состояния тканевых и клеточных структур. В последние годы все большее значение приобретают исследования комплексного влияния органических соединений как в эксперименте, так и в клинике [1, 2].

К одним из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды можно отнести бензол и хлороформ, широко распространенные в окружающей среде. Основными их источниками являются автотранспорт, предприятия газодобывающей, газо- и нефтеперерабатывающей промышленности, машиностроение. Вместе с тем, в современной литературе представлено крайне ограниченное число исследований, посвященных механизму действия указанных ксенобиотиков, реализующихся на молекулярном и клеточном уровнях и связанных с изменениями структурно-функциональных особенностей биологических молекул. Выяснение механизма взаимодействия гидрофобных низкомолекулярных веществ с белками требует проведения исследований на белковых моделях с использованием разных веществ гидрофобной природы [3, 4]. В связи с этим целью данной работы было проведение сравнительного анализа влияния хлороформа и бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования в качестве модельного раствора гемоглобина служил гемолизат эритроцитов крови человека, полученный методом «осмотического

шока», в который добавляли дистиллированную воду до конечной концентрации гемоглобина 0,03 % [5]. Раствор белка насыщали бензолом и хлороформом в стеклянных бюксах объёмом 5 мл путем наслаивания 3 мл раствора белка на 1.5 мл лиганда с последующей инкубацией образцов при комнатной температуре в течение 5, 10, 20 и 30 минут. Электрофорез проводили в трубочках в 7% ПААГ при 250-340 В при силе тока 2-5 мА на каждую трубку. Продолжительность разделения составляла 2,5-3 часа [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хлороформ и бензол оказывают денатурирующее действие на биополимеры. В данном исследовании использовали насыщения гемоглобина, при которых медленно устанавливается равновесие в системе хлороформ (бензол) □ вода-белок и происходит связывание лигандов гидрофобными участками молекулы белка. Возникает естественный вопрос о том, какое влияние на структуру белка оказывает связывающиеся с ним хлороформ и бензол, вследствие чего представляется важной оценка влияния этих углеводородов на структуру молекулы гемоглобина и обратимость действия данных денатурирующих агентов.

Анализ результатов проведенных исследований электрофоретических свойств белка, насыщенного хлороформом и бензолом, показывает, что в случае связывания хлороформа с гемоглобином электрофоретическая подвижность первой фракции гемоглобина по сравнению с нативным гемоглобином в течение 5, 10, 20 и 30-минутного воздействия не претерпевает никаких изменений (табл. 1). Такая же динамика отмечается и для второй фракции гемоглобина.

Таблица 1

Изменение электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием хлороформа ($M \pm m, R_f$)

Время экспозиции (мин)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с хлороформом
5	1	0,66±0,05	0,64±0,04
	2	0,58±0,04	0,57±0,06
	3	0,49±0,04	0,48±0,05
10	1	0,67±0,06	0,68±0,04
	2	0,58±0,05	0,6±0,04
	3	0,51±0,05	0,52±0,04
20	1	0,68±0,05	0,61±0,05
	2	0,56±0,04	0,51±0,03
	3	0,52±0,03	0,41±0,03*
30	1	0,65±0,05	0,65±0,03
	2	0,57±0,04	0,54±0,03
	3	0,5±0,06	0,39±0,01*

Примечание: *- достоверность различий показателей по сравнению с контрольными образцами ($p < 0,05$).

Содержание 3-ей фракции гемоглобина при взаимодействии ее с лигандом достоверно снижалось : при 20- и 30-минутной икубации с хлороформом – на 21,2 % и

22 % соответственно, в то время как кратковременное влияние лиганда (5- и 10-минутное воздействие) не вызывало выраженных изменений в ее содержании. Таким образом, 3-я фракция гемоглобина наиболее подвержена воздействию хлороформа.

Также было исследовано влияние бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина. Полученные данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что в случае связывания гемоглобина с бензолом в условиях 5- и 10-минутного влияния лиганда электрофоретическая подвижность достоверно не изменялась. При более длительном воздействии бензола, в частности, при 20-минутной инкубации отмечалось снижение электрофоретической подвижности первой фракции гемоглобина на 22%, при 30-минутной \square на 23,1%. Для второй фракции гемоглобина была отмечена та же динамика: 20-минутное взаимодействие гемопротеида с бензолом снижало электрофоретическую подвижность на 17,9%, а взаимодействие с бензолом в течение 30 минут уменьшало исследуемый показатель на 21,0%.

Таблица 2

**Изменение электрофоретической подвижности гемоглобина
под влиянием бензола ($M \pm m, R_f$)**

Время экспозиции (мин)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с бензолом
5	1	0,66±0,05	0,66±0,05
	2	0,58±0,04	0,59±0,06
	3	0,49±0,04	0,47±0,02
10	1	0,67±0,06	0,66±0,07
	2	0,58±0,05	0,59±0,06
	3	0,51±0,05	0,5±0,04
20	1	0,68±0,05	0,53±0,04*
	2	0,56±0,04	0,46±0,02*
	3	0,52±0,03	0,45±0,03
30	1	0,65±0,05	0,5±0,04*
	2	0,57±0,04	0,45±0,03*
	3	0,5±0,06	0,39±0,02

Примечание: * - достоверность различий показателей по сравнению с контрольными образцами ($p < 0,05$).

При сравнении электрофоретической подвижности гемоглобина, инкубированного с бензолом и хлороформом, оба денатурирующих агента оказывают воздействие на гемопротеид, что воспроизводится во всех электрофоретических экспериментах, как при инкубации гемопротеида с хлороформом, так и при инкубации с бензолом.

Интересен тот факт, что при влиянии хлороформа выраженным изменениям подвергается лишь 3-я фракция гемоглобина, а под воздействием бензола изменения претерпевают 1-я и 2-я фракции.

Одним из возможных объяснений наблюдаемого изменения электрофоретической подвижности гемоглобина крови под действием хлороформа

и бензола может быть образование дисульфидных мостиков -S-S- за счет -SH-групп глобина молекулы гемоглобина. Можно предположить, что насыщение гемоглобина как хлороформом, так и бензолом оказывает денатурирующее воздействие на структуру изучаемого гемопротеида. Как следствие, реализуется возможность образования полимерных форм белка, усиливается агрегация белковых молекул, на что указывает более плотная окраска исследуемого раствора гемоглобина после инкубации его с углеводородами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что насыщение гемоглобина крови человека низкомолекулярными углеводородами в модельном эксперименте приводит к уменьшению электрофоретической подвижности отдельных фракций исследованного гемопротеида.
2. Установлено, что при экспозиции гемоглобина с хлороформом и бензолом выявляется их сходный денатурирующий эффект, начинающийся после 20-минутного воздействия лигандов, что выражается в изменении электрофоретической подвижности фракций гемоглобина, инкубированных с изученными углеводородами.

Список литературы

1. Михайлова И.В. Влияние бихромата калия, бензола и смеси веществ на иммунный ответ мышей / И.В. Михайлова, А.И. Смолягин, Е.В. Ермолина и др. // Вестник ОГУ. - 2009. - №6. - С. 249-251.
2. Ермолина Е.В. Исследование длительного комбинированного влияния бензола и хрома на морфофункциональное состояние нейроэндокринной и иммунной систем крыс Вистар / Е.В. Ермолина, А.А. Стадников, И.В. Михайлова, А.И. Смолягин // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2012. - Т. 14, №5(2). - С. 444-447.
3. Воронин В.М. Изучение канцерогенности хлороформа / В.М. Воронин, Н.Н. Литвинов, В.И. Казачков // Вопросы онкологии. - 1987. - Т.33, №8. - С.81-85.
4. Васьковская Л. Ф. Циркуляция и трансформация хлорфосфатов, ртутьпроизводных препаратов в системе окружающая среда биологический объект / Л. Ф. Васьковская - К.: Наукова думка, 1985. - С.156.
5. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. Biochem. - 1949. - Vol.21 - P.224 - 226.
6. Гааль Э, Медыша Г, Верецкий А. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медыша, А.Верецкий. - М.: Мир, 1982. - 446 с.

SHORT-TERM EFFECTS OF DENATURING HYDROPHOBIC AGENTS ON THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF HUMAN HEMOGLOBIN

Gidulyanov A.A.

*Southern Branch NUL&ES of Ukraine "Crimean Agrotechnological University", Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: sgaa@mail.ru*

Influence of a complex of chemical substances in the concentration most often meeting in actual practice, in most cases causes nonspecific reactions of an organism of different degree of expressiveness which depend from morphofunctional conditions of fabric and cellular structures. Last years the increasing value is got by researches of complex influence of organic connections both in experiment, and in clinic.

It is possible to carry benzole and chloroform to one of the most widespread pollutants of environment. Benzole and chloroform widespread in environment as their basic sources are motor transport, the enterprises gas, gazo - and petroleum-refining industry, mechanical engineering. At the same time till now in the literature there is the extremely limited number of the researches devoted to the mechanism of action specified xenobiotics, realised on molecular both cellular levels and connected with changes of structure of biological molecules, and, hence, and with functions carried out by them. Finding-out of the mechanism of interaction of waterproof low-molecular substances with fibers demands carrying out of researches on albuminous models with use of different substances of the waterproof nature. In this connection carrying out of the comparative analysis of influence of chloroform and benzole on electrophoretic mobility of haemoglobin was the purpose of this research.

Keywords: hemoglobin, chloroform, benzole, electrophoretic mobility.

References

1. Mikhailova I.V. Effect of potassium dichromate, benzole and mixtures of substances on the immune response of mice / I.V.Mihaylova, A.I. Smolyagin, E.V. Ermolina et al. // Vestnik OGU. - 2009. - №6.- P. 249-251.
2. Ermolina E.V. Long study of the combined influence of benzole and chromium on the morphofunctional state of the neuroendocrine and immune systems in Wistar rats / E.V. Ermolina, A.A. Stadnikov, I.V. Mikhailov, A.I. Smolyagin // the Samara Scientific Center of the Russian Academy Science.- 2012.- T. 14, №5 (2) .- P. 444-447.
3. Voronin V.M., Litvinov N.N., Kazatchkov V.I. Study carcinogenicity of chloroform, *Problems of Oncology*, **33**, 81-85 (1987).
4. Vaskovskaya L.F. *Circulation and transformation chlorophosphate, rtutproizvodnyh drugs in the system environment to biological*, 156 p. (Naukova Dumka, 1985).
5. Drabkin D.A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline, *Arch. Biochem*, **21**, 224 – 226 (1949).
6. Gaal E., Medysha F., Veretsky A. *Electrophoresis separation of biological macromolecules*, 446 p. (Nauka, 1982).

Поступила в редакцию 08.10.2014 г.