

УДК 577.112.4

ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ГИДРОФОБНЫХ АГЕНТОВ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА

Гидулянов А.А.

*Южный филиал национального университета биоресурсов и природопользования Украины
«Крымский агротехнологический университет», Симферополь, Республика Крым,
Российская Федерация
E-mail: sgaa@mail.ru*

Проведено сравнительное исследование влияния хлороформа и бензола на электрофоретическую подвижность фракций гемоглобина. В результате исследований получены данные, свидетельствующие об изменении электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием углеводов.

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

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение промышленного производства химических веществ и расширение их ассортимента, связанные с возрастающими потребностями развивающихся технологий, неизбежно влекут за собой усиление вызываемой ими экологической опасности. Исследование токсического влияния ксенобиотиков на организм является актуальной медико-биологической проблемой. Ксенобиотики распространены повсеместно – в окружающей среде, на производстве, в фармации, в бытовой жизни [1, 2]. Более 200 ксенобиотиков окружают современного человека в быту и на производстве. Тем не менее механизмы адаптации организма к их воздействию до настоящего времени изучены недостаточно полно. В частности, это относится к действию ксенобиотиков на систему эритроцита и последствиям этого действия. Решение данных вопросов может представлять научный интерес как для практической, так и для теоретической медицины [1, 2].

Высокая степень антропогенной нагрузки объясняет необходимость разработки подходов, позволяющих выявлять ее последствия еще на начальных этапах воздействия. Это прежде всего должно касаться оценки состояния систем, в первую очередь, реагирующих на загрязнители окружающей среды, что определяется как химической природой токсикантов, так и механизмами их биотрансформации [4, 5]. В настоящее время большое внимание уделяется потенциальной опасности хлорорганических соединений, образующихся на различных этапах очистки и обеззараживания питьевой воды на водопроводных станциях. В наибольших количествах образуется хлороформ, для которого не установлена научно обоснованная ПДК в питьевой воде [6, 7]. Органические вещества широко используются в качестве растворителей. Среди таких веществ – хлороформ и бензол [7, 8].

Проблема влияния хлороформа и бензола на живые организмы в последнее время привлекает все большее внимание. Известны системные и клеточные механизмы токсического действия, однако молекулярные механизмы мало изучены. Нарушения в нормальном функционировании живых организмов заставляют задуматься о механизмах действия указанного фактора, реализующихся на молекулярном и клеточном уровнях и связанных с изменениями структуры биологических молекул, а, следовательно, и с выполняемыми ими функциями [8, 9].

В частности большой интерес представляет выяснение механизмов воздействия низкомолекулярных углеводородов и их галогенпроизводных гидрофобной природы на конформационные переходы биополимеров, осуществляющиеся на молекулярном и клеточном уровне. Выяснение механизма взаимодействия гидрофобных низкомолекулярных веществ с белками требует проведения исследований на белковых моделях с использованием разных веществ гидрофобной природы [10, 11]. В связи с этим целью данной работы было проведение сравнительного анализа влияния хлороформа и бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служил гемолизат эритроцитов крови человека, как модельный раствор гемоглобина. Гемолизат получали методом "осмотического шока". После этого в полученный гемолизат добавляли дистиллированную воду до конечной концентрации гемоглобина 0,03% [12]. 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. Инкубацию образцов проводили в течение 0,5, 1, 6 и 12 часов. Электрофорез проводили в трубочках в 7% ПААГ. Разделение проводили при 250-340В при силе тока 2-5 мА на каждую трубку. Продолжительность разделения составляла 2,5-3 часа [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Низкомолекулярные растворители, к числу которых относится хлороформ и бензол, оказывают сильное денатурирующее действие на биополимеры. Однако 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 связывающийся с ним хлороформ и бензол. Поэтому представляется важным оценка влияния углеводородов на структуру молекулы гемоглобина и обратимость действия данных денатурирующих агентов. В связи с этим проведены исследования электрофоретических свойств белка, насыщенного хлороформом и бензолом.

Как видно из таблицы 1 в случае связывания хлороформа с гемоглобином наблюдается достоверное снижение электрофоретической подвижности ($p < 0,05$). Электрофоретическая подвижность первой фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом по сравнению с нативным гемоглобином

уменьшилась за первые 30 минут на 12,3%, через 1 час продолжила незначительно уменьшаться - на 14,2%, при более длительной, 6 часовой инкубации отмечалось более значительное уменьшение - на 22,7%. Как видно, в случае связывания хлороформа с белком при максимальной, 12-часовой экспозиции 1 фракция подверглась наиболее выраженным изменениям, проявившимся в максимальном снижении ее электрофоретической подвижности - на 44,1%.

Таблица 1

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

Время экспозиции (час)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с хлороформом
0,5	1	0,65±0,05	0,57±0,04
	2	0,57±0,04	0,45±0,03*
	3	0,5±0,06	0,29±0,03*
1	1	0,63±0,06	0,54±0,04
	2	0,53±0,05	0,41±0,04
	3	0,39±0,03	0,22±0,02*
6	1	0,66±0,04	0,51±0,03*
	2	0,57±0,05	0,43±0,03*
	3	0,5±0,05	0,24±0,03*
12	1	0,68±0,05	0,38±0,03*
	2	0,59±0,04	0,47±0,03*
	3	0,52±0,04	0,4±0,03*

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

Электрофоретическая подвижность второй фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом, по сравнению с нативным гемоглобином, уменьшилась после его 30 минутного воздействия - на 21,1%, в 1 час - на 22,6%, при 6 часовом воздействии - на 24,6%, а после 12 часов - на 20,3%. Наиболее подверженной воздействию хлороформа оказалась 3 фракция гемоглобина, чья электрофоретическая подвижность по сравнению с нативным гемоглобином уменьшилась через 30 минут - на 42%, через 1 час - на 43,6%, в 6 часовой период влияния - на 52% и после 12 часовой инкубации - на 23%.

Практически во всех 4 экспозициях в случае связывания хлороформа с гемоглобином наблюдается достоверное снижение электрофоретической подвижности. Во всех поставленных экспериментах при 12-часовой экспозиции происходила денатурация гемоглобина, были видны хлопьяподобные структуры. При анализе электрофоретической подвижности взаимодействия белковых молекул

с хлороформом, т.е. за все время экспозиции, наиболее выраженные изменения электрофоретической подвижности наблюдаются при 6 часовой экспозиции.

Известно, что образование полимеров зависит от дисульфидных мостиков S-S за счет SH-группы. SH-группы, входящие в состав гемоглобина - по одной в α -цепи и по две в β -цепи, играют весьма существенную роль в выполнении основной функции гемоглобина [16]. При взаимодействии лигандов с белком возможно происходит изменение заряда белка, в следствии лиганд-индуцированных конформационных изменений полипептидной цепи, приводящих к соответствующим изменениям в пространственном расположении аминокислотных радикалов. Поэтому можно предположить, что 6 часовое воздействие хлороформа приводит к максимальному образованию дисульфидных мостиков и конформационные изменения в молекуле белка приводят к тому, что доступность других, еще не вовлеченных в процесс образования сшивок SH-групп, становится затруднительным, что и отражается в дальнейшем менее выраженном снижении электрофоретической подвижности фракций гемоглобина при 12 часовой экспозиции.

Также было исследовано влияние бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

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

Время экспозиции (час)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с бензолом
0,5	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
1	1	0,63±0,06	0,48±0,02*
	2	0,53±0,05	0,41±0,02*
	3	0,39±0,03	0,30±0,01*
6	1	0,66±0,04	0,49±0,04*
	2	0,57±0,05	0,43±0,02*
	3	0,5±0,05	0,29±0,03*
12	1	0,68±0,05	0,34±0,03*
	2	0,59±0,04	0,51±0,04
	3	0,52±0,04	0,42±0,02*

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

Как следует из данных таблицы 2 в случае связывания гемоглобина с бензолом наблюдается снижение электрофоретической подвижности. Электрофоретическая

подвижность первой фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом по сравнению с нативным гемоглобином уменьшилась после 30 минут инкубации на 23,1%, в 1 час - на 23,8%, в 6 часовой экспозиции - на 25,7%. Как видно в случае связывания бензола с белком при 12 часовом воздействии бензола электрофоретическая подвижность 1 фракции проявила максимум снижения – на 50% относительно контрольных показателей. Электрофоретическая подвижность второй фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом по сравнению с нативным гемоглобином уменьшилась на 21,1%, 22,6%, 24,6% и 13,6% соответственно временным рамкам инкубации в условиях проводимого эксперимента.

Для третьей фракции гемоглобина была характерна та же тенденция – снижение составило 22% при взаимодействии с бензолом в течение 30 минут, на 23,1% - при 1 часовой инкубации, на 42% - при 6 часовом воздействии бензола и на 19,2 после 12 часов экспозиции. Практически во всех 4 экспозициях в случае связывания бензола с гемоглобином наблюдается достоверное снижение электрофоретической подвижности ($p < 0,05$). При анализе электрофоретической подвижности взаимодействия белковых молекул с бензолом, т.е. за все время экспозиции, наиболее выраженные изменения электрофоретической подвижности наблюдаются так же при 6 часовом воздействии.

При сравнении электрофоретической подвижности гемоглобина, инкубированного с бензолом и хлороформом, оба денатурирующих агента оказывают равнозначное воздействие на гемопротеид. Данные явления воспроизводятся во всех электрофоретических экспериментах, как при инкубации гемопротеида с хлороформом, так и при инкубации с бензолом. Это позволяет выдвинуть предположение о том, что насыщение гемоглобина как хлороформом, так и бензолом оказывает денатурирующее действия на структуру изучаемого белка. Можно предположить возможность образования полимерных форм белка, что свидетельствует об усилении агрегации белковых молекул, о чем свидетельствует более плотная окраска исследуемого белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что в условиях насыщения гемоглобина хлороформом и бензолом происходит снижение электрофоретической подвижности всех его фракций.
2. Установлено, что в условиях проведенных экспозиций гемоглобина с исследуемыми лигандами выявляется их сходный денатурирующий эффект, что выражается в близкой электрофоретической подвижности фракций гемоглобина, инкубированных с изученными углеводородами.

Список литературы

1. Бонашевская Т.И. Морфологическая оценка изолированного и сочетающего действия химических и физических факторов окружающей среды / Т.И. Бонашевская, М.А. Пинигин // Гигиена и санитария. – 1991. – №2. – С.54.
2. Красовский Г.Н. Обоснование предельно допустимой концентрации хлороформа в питьевой воде / Г.Н. Красовский, А.П. Ильницкий, В.М. Воронин // Гигиена и санитария. – 1991. – №2. – С.14-15.