

УДК 577.322: 537.632.5

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГИДРОФОБНЫХ ЛИГАНДОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕМОГЛОБИНА

Мартынюк В. С., Цейслер Ю. В.

ВВЕДЕНИЕ

В проведенных ранее исследованиях было установлено, что взаимодействие гидрофобного лиганда хлороформа с гем-содержащим белком - цитохромом С, - при медленном установлении равновесия, в так называемых «мягких» условиях, приводит к формированию «голубого» сдвига в области пика *Soret* [1]. При этом было обнаружено, что воздействие слабым переменным магнитным полем ускоряет формирование указанного спектрального сдвига, на основании чего был сделан вывод об усилении связывания хлороформа с белками [2,3].

Для объяснения обнаруженных явлений было предложено два альтернативных механизма формирования спектральных сдвигов [1]. Первый предполагаемый механизм основывается на том, что хлороформ, связываясь с белком по гидрофобному механизму, оказывает денатурирующее действие на пространственную структуру молекулы белка, в результате чего открывается доступ полярным молекулам воды к хромофорам, исходно находящимся в гидрофобном окружении внутри белковой глобулы. Данный механизм основывается на общеизвестном факте о разрушающем действии хлороформа на биологические структуры.

Второе объяснение спектральных изменений также основывается на представлениях о том, что хлороформ связывается в гидрофобных полостях молекулы белка, однако сильного денатурирующего воздействия такое взаимодействие не оказывает, о чем свидетельствовали незначительное снижение активности фермента – цитохрома С, насыщенного хлороформом [1], а также данные других авторов, полученные на моделях с разными белками и разными углеводородами [3,4,5]. Поэтому в данном случае в качестве причины формирования «голубых» сдвигов предполагали частичную полярность молекулы хлороформа, характеризующуюся не нулевым дипольным моментом.

Выяснение механизма взаимодействия гидрофобных низкомолекулярных веществ с белками требует проведения исследований на других белковых моделях использованием разных веществ гидрофобной природы. В связи с этим целью данной работы было проведение сравнительного анализа влияния хлороформа и бензола на спектры оптического поглощения гемоглобина.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГИДРОФОБНЫХ ЛИГАНДОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕМОГЛОБИНА

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служил раствор гемоглобина в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М/л, который получен путем гемолиза эритроцитов.

В данном исследовании, так же как и в ряде предыдущих работ [1,2], в качестве базовой экспериментальной модели было использовано явление насыщения растворов белка низкомолекулярными лигандами гидрофобной природы. Объектом исследования служил гемоглобин, насыщаемый хлороформом и бензолом. О связывании гидрофобных лигандов с белком судили по характерным изменениям спектра поглощения гемоглобина в области пика *Soret*.

Насыщение растворов гемоглобина хлороформом и бензолом осуществляли в стеклянных бюксах путем насаивания 3 мл раствора белка на 1,5 мл низкомолекулярного лиганда с последующей инкубацией образцов при комнатной температуре. Инкубацию образцов проводили в течение 2 часов, по окончании которой регистрировали интегральные спектры растворов гемоглобина, насыщенных хлороформом и бензолом. Дифференциальные спектры получали как разность между интегральными спектрами растворов нагруженного углеводородами и нативного белка.

Математическую обработку результатов проводили в соответствии с общепринятыми правилами вариационной статистики. Для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены интегральные спектры поглощения гемоглобина в области поглощения гема 350-450 нм (полосы *Soret*) с максимумом оптической плотности в контрольных образцах на длине волны $\lambda_{\text{max}} = 415$ нм. Как видно, насыщение раствора гемоглобина хлороформом приводит к снижению значений оптической плотности в области максимума поглощения в среднем на 5 %. Данное явление в литературе известно как *гипохромный эффект* [7]. Однако анализ дифференциальных спектров (рис. 2) показал, что на фоне общего снижения оптической плотности имеет место сдвиг пика *Soret* в область более коротких длин волн, что приводит к формированию «голубого» сдвига на дифференциальном спектре с характерным минимумом в области 418-420 нм. Подобное явление спектрального сдвига основной полосы поглощения гема в коротковолновую область при насыщении белка хлороформом было обнаружено ранее в исследованиях на модели с цитохромом *C* [1]. Поэтому данные, полученные в настоящем исследовании указывают на общие закономерности процесса взаимодействия хлороформа с белками, в частности с гем-содержащими.

Отдельный интерес представляет изучение взаимодействия бензола с гемоглобином, так как бензол, в отличие от хлороформа, характеризуется отсутствием дипольного момента, а также используется в качестве неспецифического лиганда, позволяющего оценить объем гидрофобных полостей белков [8]. Как видно из рисунка 1 при взаимодействии бензола с гемоглобином имеет место менее выраженное снижение оптической плотности в области пика *Soret*. Одновременно с этим отсутствие выраженного гипохромного эффекта позволяет четко регистрировать смещение полосы *Soret* в длинноволновую область в виде «голубого» сдвига с минимумом в области 420-422 нм (рис. 2).

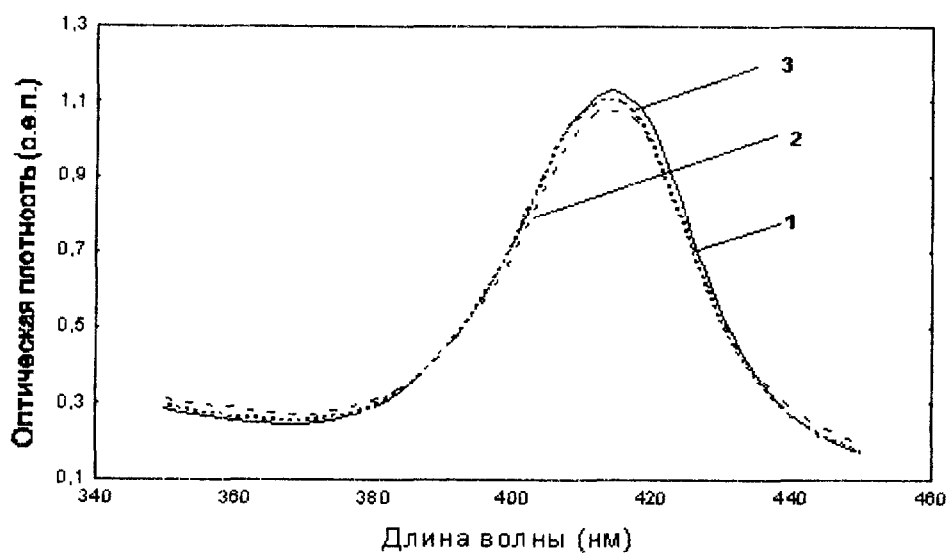


Рис 1. Интегральные спектры водных растворов гемоглобина через 2 часа инкубации:

- 1- растворы чистого белка;
- 2- растворы белка, инкубированного с хлороформом;
- 3- растворы белка, инкубированного с бензолом.

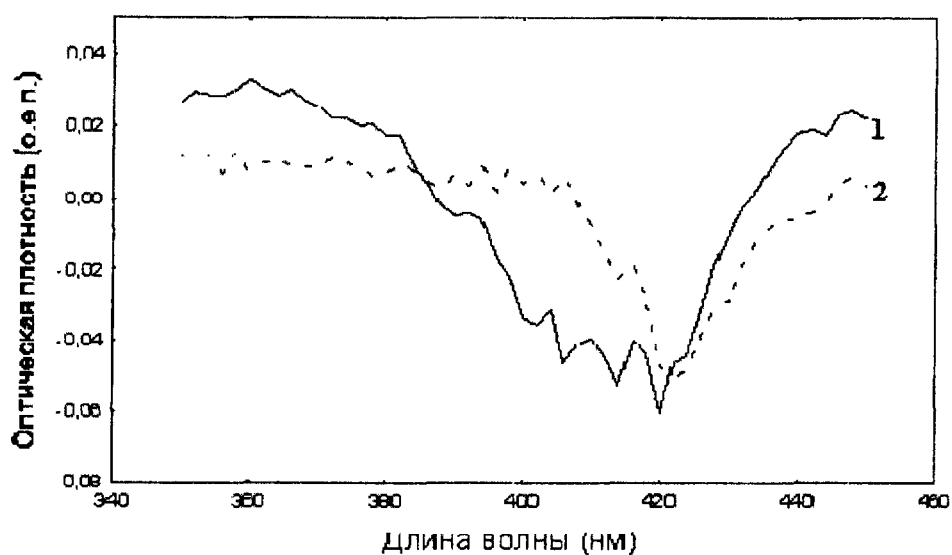


Рис. 2. Дифференциальные спектры водных растворов гемоглобина через 2 часа инкубации:

- 1- растворы белка, инкубированного с хлороформом;
- 2- растворы белка, инкубированного с бензолом.

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГИДРОФОБНЫХ ЛИГАНДОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕМОГЛОБИНА**

Таким образом, полученные данные указывают на то, что при насыщении гемоглобина хлороформом и бензолом происходит изменение параметров среды, окружающей гем. Согласно установившимся представлениям о спектральных сдвигах в биополимерах [7], «голубой» сдвиг связан с переходом хромофора в более полярную среду. Таковой для белков в первую очередь является полярный растворитель – вода. В работе [1] было высказано предположение о том, что одной из причин формирования «голубого» сдвига также может быть образование в гидрофобных полостях белковой молекулы слабополярной фазы хлороформа (дипольный момент молекулы хлороформа $\mu_{\text{хлороформ}} = 1.06 \text{ D}$). Однако, в экспериментах с бензолом также регистрируется «голубой» сдвиг, что тоже указывает на усиление взаимодействия гема с полярной фазой. Следует заметить, что молекула бензола связывается в гидрофобных полостях белковых молекул, но имеет нулевой дипольный момент. Основываясь на этих фактах, можно сделать вывод о том, что в обоих случаях «голубой» спектральный сдвиг в исследуемых модельных условиях формируется в результате усиления взаимодействия гема с полярными молекулами воды. Об этом также свидетельствует сходство основных параметров дифференциальных спектров (табл.). Связывание углеводов и их производных в гидрофобных полостях белковых молекул индуцирует изменения пространственной структуры макромолекулы и тем самым открывает доступ молекулам воды к внутренним гидрофобным полостям, в которых располагаются порфириновые структуры.

Таблица
Влияния хлороформа и бензола на основные характеристики дифференциальных спектров гемоглобина при совместной инкубации белка с лигандами

<i>Параметр</i>	<i>Инкубация с хлороформом</i>	<i>Инкубация с бензолом</i>
λ_{max} , нм	0,380±0,003	0,393±0,003
λ_{min} , нм	0,418±0,001	0,420±0,002
$\lambda_{\text{min}} - \lambda_{\text{max}}$, нм	0,033±0,003	0,026±0,002
$D_{\text{max}} - D_{\text{min}}$, е.о.п.	0,157±0,025	0,135±0,010

Таким образом, лиганд-индуцированные конформационные перестройки макромолекулы белка являются основным фактором, приводящим к формированию коротковолновых спектральных сдвигов.

Как известно, хлороформ является сильным денатурирующим агентом, что нашло широкое его применение в качестве основного компонента в различных разрушающих и экстрагирующих смесях. Вероятно, именно с этим свойством данного вещества связаны два других зарегистрированных спектральных эффекта - гипохромного эффекта и устойчивой тенденции к повышению оптической плотности в области неспецифического поглощения 350-360 нм (рис. 1).

Согласно [7], гипохромный эффект может свидетельствовать об усилении межмолекулярных взаимодействий (в том числе и взаимодействий между хромофорами), что должно способствовать образованию молекулярных ассоциатов. Такие крупные частицы более эффективно рассеивают свет. Поэтому повышение оптической плотности на 15% в неспецифической области поглощения гемоглобина в диапазоне длин волн 350-360 нм наиболее вероятно связано не с увеличением поглощения света растворами белка, а с увеличением их светорассеивания вследствие повышенной агрегации белковых молекул. Такая агрегация была установлена при исследовании взаимодействия хлороформа с сывороточным альбумином [2].

ВЫВОДЫ

Анализ полученных результатов позволяет сделать ряд следующих выводов.

1. Связывание низкомолекулярных неполярных веществ (хлороформа и бензола) в гидрофобных полостях гемоглобина индуцирует конформационные изменения молекулы белка, в результате которых открывается доступ молекулам воды к гемовым структурам, что отражается в виде спектрального сдвига пика *Soret* в область меньших длин волн ("голубой" сдвиг).

2. Насыщение гемоглобина хлороформом индуцирует более глубокие конформационные изменения, приводящие к образованию белковых агрегатов, которые более интенсивно рассеивают свет.

Список литературы

1. Мартынюк В. С., Калиновский П. С., Цейслер Ю. В. Влияние слабого магнитного поля крайне низкой частоты на спектральные характеристики цитохрома *c* в присутствии хлороформа // Учёные записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского/ Сер. "Биология". - 2002. - Т. 14, №3. - С.121-126.
2. Калиновский П. С., Мартынюк В. С. Действие переменных магнитных полей на связывание гидрофобных лигандов сывороточным альбумином // Учёные записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Сер. «Биология». - 2000. - Т. 14, №2. - С. 89-93.
3. Ахрем А.А., Тищенко Е.И., Киселев П.А., Метелица Д.И. Спектральные характеристики взаимодействия цитохрома *c* и гемоглобина с метанололом и анилином // Биохимия. - 1978. - Т. 43, вып. 11. - С. 2033-2037.

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГИДРОФОБНЫХ ЛИГАНДОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕМОГЛОБИНА**

4. Мартынюк В.С., Шадрин О.Г. Влияние переменного магнитного поля крайне низкой частоты на растворимость бензола в воде и растворах белка // Биомедицинская радиоэлектроника. – 1999, № 2. - С. 56-60.
5. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. М.:Наука, - 1974. - 286 с.
6. Черников Ф.Р. Влияние некоторых физических факторов на колебания светорассеяния в воде и водных растворах биополимеров // Биофизика. - 1990. Т. 35, вып. 5. - С. 711- 715.
7. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев: Наукова думка, 1981. 208 с.
8. Коношенко С.В., Гидулянов А.А. Внутримолекулярная структура и окислительная модификация главных фракций гемоглобинов отдельных представителей млекопитающих и рыб // Біополімери і клітина. – 2003. – Т.19, №6. – С.521 – 525.

Поступила в редакцию 15.12.2003 г.