

УДК 577.322 : 537.632.5

Мартынюк В.С., Калиновский П.С., Цейслер Ю.В.

ВЛИЯНИЕ СЛАБОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ КРАЙНЕ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТОХРОМА С В ПРИСУТСТВИИ ХЛОРОФОРМА

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям первичные механизмы воздействия ПемП реализуются на уровне структурных перестроек молекулярных ассоциатов воды [1], которые могут играть важную роль в динамическом поведении и функционировании биополимеров [2].

Показано, что в воде и водных растворах имеет место возникновение пространственно-временного порядка за счет сил дальнего действия, который может быть изменен или разрушен слабыми воздействиями [3]. Предполагается, что изменение структурно-динамических свойств водной фазы может приводить к изменению гидрофильно-гидрофобного баланса в коллоидных системах [4]. Подтверждением этого предположения следует рассматривать данные об изменении оптических свойств растворов глицилтриптофана [4], а также растворимости бензола и ретинолацетата в воде и водных растворах альбумина [5,6].

В связи с этим целью настоящего исследования была оценка влияния ПемП на спектральные характеристики *цитохрома с*, вызванных взаимодействием раствора белка с агентом гидрофобной природы – хлороформом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании, так же как и предыдущих работах [5,6], в качестве базовой модели гидрофобных взаимодействий было использовано явление насыщения растворов белка низкомолекулярными углеводородами и их галогенпроизводными гидрофобной природы [7]. Насыщение 0.05 %-ных растворов *цитохрома с* хлороформом осуществляли путем наслаивания 3 мл раствора белка на 1.5 мл хлороформа с последующей инкубацией образцов при комнатной температуре 22-24°C. Лиофильный электрофоретически чистый препарат *цитохрома с* (окисленная форма) был любезно предоставлен научно-производственной компанией «Биоритм» (Украина). Водные растворы *цитохрома с* характеризовались максимумом поглощения полосы Core 408-409 нм. По окончании установленного срока инкубации регистрировали дифференциальные спектры растворов *цитохрома с*, насыщенных хлороформом, против растворов данного белка, находящихся в тех же условиях без добавления хлороформа.

Для моделирования окислительно-восстановительных процессов, протекающих с участием *цитохрома с* использовали реакцию восстановления белка раствором

аскорбиновой кислоты в конечной концентрации 0,11 мМ/л. К 1,5 мл 0,05% раствора *цитохрома с* добавляли 0,2 мл 1 мМ раствора аскорбиновой кислоты рН=7.0. Перед измерением активности растворы *цитохрома с* в объеме 1,5 мл инкубировали с 0,5 мл хлороформом в течение 1, 2 и 3 часов при температуре 20-23⁰С. Активность фермента оценивали по изменению оптической плотности при длине волны $\lambda=550$ нм.

Импульсное магнитное поле создавали кольцами Гельмгольца. Импульсы были прямоугольной формы и разной полярности. Частота магнитного поля составляла 8 Гц, индукция 25 μ Т. Вектор индукции создаваемого магнитного поля был параллельным вектору геомагнитного поля. Опытные образцы помещали в кольца Гельмгольца. Контрольные пробы находились в условиях фоновых значений ПемП, характерных для данной лаборатории (20-65 нТ). Для оценки возможного влияния различий в уровне фоновых ЭМП в местах расположения опытных и контрольных образцов проводили эксперименты с ложным воздействием МП. В этом случае опытные образцы помещали в кольца Гельмгольца, но не подвергали воздействию МП.

Для оценки достоверности влияния МП КНЧ использовали t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

На рисунке 1 представлены дифференциальные спектры раствора *цитохрома с* Как видно при его насыщении хлороформом спектр поглощения претерпевает «голубой сдвиг». Согласно [8] это свидетельствует об увеличении полярности среды, окружающей хромофор. В данном эксперименте увеличение полярности среды может быть вызвано двумя причинами, которые не исключают друг друга и могут реализоваться одновременно.

В первом случае «голубой сдвиг» может быть вызван большей доступностью молекул воды к хромофору (гему). Учитывая, что в нативном *цитохроме с* гем почти полностью погружен в гидрофобную полость белковой глобулы и практически недоступен полярному растворителю, «голубой сдвиг» можно интерпретировать как свидетельство частичной денатурации белка, вызванной связыванием хлороформа, и экспонирования хромофора (гема) к полярному растворителю – воде.

Во втором случае, «голубой сдвиг» может быть вызван связыванием молекул хлороформа с гидрофобными полостями *цитохрома с*. Несмотря на то, что хлороформ относят к группе неполярных веществ, молекула данного вещества характеризуется достаточно высоким для неполярных веществ дипольным моментом $\mu_{\text{хлороформ}}=1.06$ D (для сравнения $\mu_{\text{вода}}=1.84$ D, $\mu_{\text{бензол}} \approx \mu_{\text{гептан}} \approx 0$ D). Это свойство молекул хлороформа, заполняющих гидрофобные полости белка, также может вносить существенный вклад в формирование наблюдаемого в эксперименте «голубого сдвига». Согласно [7], связывание углеводов в гидрофобных полостях молекул белков, растворенных в воде не приводит к существенным конформационным изменениям. В связи с этим наиболее обоснованным, является предположение о том, что наблюдаемый «голубой сдвиг» происходит в результате заполнения гидрофобных полостей *цитохрома с* слабополярными молекулами

ВЛИЯНИЕ СЛАБОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ КРАЙНЕ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТОХРОМА С В ПРИСУТСТВИИ ХЛОРОФОРМА

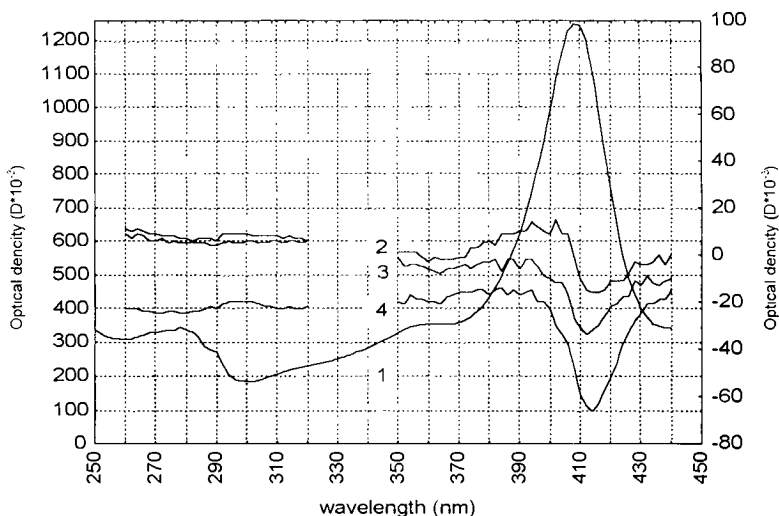


Рис. 1 Интегральный (1. левая шкала) и дифференциальные (2-4. правая шкала) спектры 0.05% растворов *цитохрома с* через 2 (2), 4 (3) и 24 (4) часа инкубации с хлороформом.

Табл. 1. Основные характеристики дифференциальных спектров *цитохрома с*

| Время экспозиции (ч) | Параметр | Контрольные образцы (нм) | Ложное воздействие (нм) | Магнитное поле (нм) | Изменение относительно контрольных образцов (%) | Изменение относительно ложного воздействия (%) |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|--|---|--|
| 2 | λ_{\max} | $397,3 \pm 1,9$ | $394,0 \pm 3,8$ | $387,8 \pm 5,0^*$ | -2,9 | -1,6 |
| 4 | λ_{\max} | $391,5 \pm 3,0$ | $398,8 \pm 1,6$ | $390,3 \pm 4,3^{**}$ | -0,6 | -2,1 |
| 24 | λ_{\max} | $393,2 \pm 1,8$ | $395,8 \pm 2,2$ | $391,0 \pm 5,1$ | -1,1 | -1,2 |
| 2 | λ_{\min} | $413,9 \pm 0,5$ | $415,0 \pm 1,3$ | $413,0 \pm 0,9$ | -0,2 | -0,5 |
| 4 | λ_{\min} | $412,7 \pm 0,7$ | $414,3 \pm 2,6$ | $413,9 \pm 0,7$ | 0,3 | -0,1 |
| 24 | λ_{\min} | $414,4 \pm 0,4$ | $415,2 \pm 0,4$ | $415,0 \pm 1,0$ | 0,0 | 0,0 |
| 2 | $\lambda_{\min}-\lambda_{\max}$ | $16,7 \pm 1,7$ | $21,0 \pm 3,4$ | $25,2 \pm 4,3^*$ | 76,2 | 20 |
| 4 | $\lambda_{\min}-\lambda_{\max}$ | $21,3 \pm 2,9$ | $15,5 \pm 2,9$ | $23,6 \pm 3,7^{**}$ | 24,0 | 52,3 |
| 24 | $\lambda_{\min}-\lambda_{\max}$ | $21,2 \pm 1,9$ | $19,4 \pm 2,4$ | $24,0 \pm 4,1$ | 32,7 | 23,7 |
| 2 | $D_{\max}-D_{\min}$ | $34,0 \pm 2,4$ | $38,3 \pm 7,1$ | $38,3 \pm 5,8$ | 12,6 | 0,0 |
| 4 | $D_{\max}-D_{\min}$ | $32,1 \pm 2,7$ | $34,5 \pm 4,2$ | $33,0 \pm 3,0$ | 2,8 | -4,4 |
| 24 | $D_{\max}-D_{\min}$ | $46,3 \pm 2,8$ | $45,6 \pm 3,9$ | $54,8 \pm 1,6^{***}$ | 18,3 | 20,1 |

Примечание: * - достоверные отличия относительно контрольных образцов; ** - достоверные отличия относительно ложной экспозиции.

хлороформа, которые в дополнение к этому оказывают частичное денатурирующее действие и открывают доступ гема к воде.

Следует обратить внимание, что процесс насыщения раствора *цитохрома с* характеризуется определенной динамикой в дифференциальных спектрах (рис. 1). По мере насыщения белка хлороформом максимум дифференциального спектра (λ_{\max}) смещается в более коротковолновую область, тогда как положение минимума (λ_{\min}) почти не изменяется. Этот процесс сопровождается также небольшим гипохромным эффектом.

Анализ дифференциальных спектров показал, что влияние импульсного магнитного поля наиболее ярко выражено в первые часы процесса насыщения растворов *цитохрома с* хлороформом. В частности, данный фактор ускоряет формирование «голубого сдвига» (табл. 1) При этом наиболее чувствительным элементом к действию магнитного поля является спектральный максимум, который претерпевает смещение в «голубую» область, а также разность длин волн $\lambda_{\min}-\lambda_{\max}$ (табл 1).

При длительной суточной экспозиции растворов *цитохрома с* в магнитном поле в дифференциальном спектре также зарегистрировано достоверное увеличение параметра $D_{\max}-D_{\min}$ (табл. 1), который согласно [9] характеризует количество связанного лиганда.

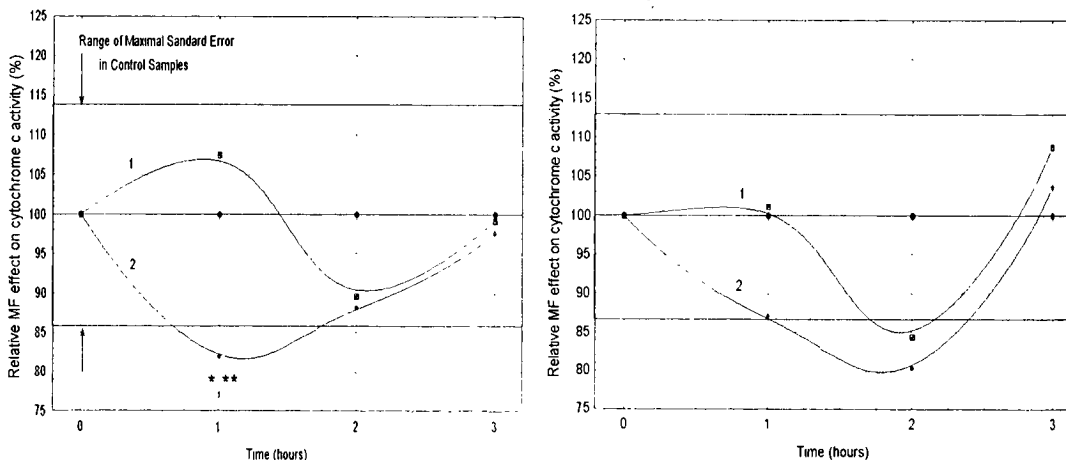


Рис. 2. Влияние переменного магнитного поля на активность *цитохрома с* насыщаемого хлороформом в % по отношению к контрольным образцам, не насыщаемых хлороформом, (левый рисунок – эксперимент с магнитным полем; правый рисунок – эксперимент с ложным воздействием; линия 1 – влияние хлороформа; линия 2 – одновременное влияние хлороформа и переменного магнитного поля; линия «100%» - контроль; *, ** - достоверное влияние магнитного поля относительно контрольных и насыщенных хлороформом образцов *цитохрома с*).

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что слабое импульсное магнитное поле край низких частот усиливает процесс связывания хлороформа с гидрофобными полостями белка. Это является дополнительным подтверждением представлений о том, что в основе биологического действия слабых переменных магнитных полей лежит изменение гидрофильно-гидрофобного баланса в водных растворах биополимеров и поверхностно-активных веществ.

Как известно, низкомолекулярные органические растворители, в том числе и хлороформ, являются мощными денатурирующими агентами. Возникает естественный вопрос о влиянии связывающегося хлороформа на функциональную активность *цитохрома с*. Для выяснения ясности в данную проблему были проведены исследования каталитической активности *цитохрома с* в условиях его насыщения хлороформом и воздействия переменным магнитным полем. Как видно (рис. 2) ингибирующее действие хлороформа в исследуемой модельной системе проявляется относительно слабо и, как правило, достоверно выявляется через 2 часа инкубации, а снижение ферментативной активности не превышает 10 %. Это указывает на то, что насыщение белка хлороформом в «мягких» условиях не приводит к значительным конформационным перестройкам и, соответственно, не приводит к полной потере активности изучаемого фермента.

Полученные результаты в экспериментах с магнитным полем (рис. 2) показывают, что ускорение связывания хлороформа *цитохромом с*, вызванное действием физического фактора, приводит к достоверному снижению активности фермента в первый час эксперимента на 15-20%. Данный факт свидетельствует о том, что переменное магнитное поле стимулирует связывание хлороформа *цитохромом с* и тем самым усиливает денатурирующее действие неполярного растворителя на нативную структуру белка.

ВЫВОДЫ

1. Насыщение водного раствора *цитохрома с* хлороформом сопровождается формированием «голубого сдвига» в спектре поглощения гема, что указывает на связывание хлороформа данным белком.
2. Связывание хлороформа *цитохромом с* не приводит к существенной потере активности фермента, что свидетельствует о сохранении нативной конформации данного белка.
3. Переменное магнитное поле ускоряет формирование «голубого сдвига» в области полосы Сор в спектре *цитохрома с*, что указывает на ускорение связывания хлороформа белком.
4. Переменное магнитное поле, ускоряя процесс насыщения *цитохрома с* хлороформом, приводит к достоверному снижению активности фермента на 15-20% в первые часы инкубации и тем самым усиливает денатурирующее действие неполярного растворителя.

5. Изменение белковых характеристик при комбинированном действии хлороформа и ЭМП зависит от времени воздействия, что свидетельствует о динамичности конформационных перестроек белка при действии возмущающих агентов.

Список литературы

1. Слесарев В. И., Шабров А. В. Влияние структуры воды на её статические и динамические свойства. / Тезисы докладов 2-го Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург 3-7 июля 2000. – Санкт Петербург, 2000. – С. 102 – 103.
2. Кяйверяйнен Л. И. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. - Л.: Наука, 1980.-272 с.
3. Черников Ф.Р. Влияние некоторых физических факторов на колебания светорассеяния в воде и водных растворах биополимеров // Биофизика. – 1990. – Т. 35. – в. 5. – С. 711- 715.
4. Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шихлинская Р.Э. Спонтанные и индуцированные внешними электромагнитными полями долговременные переходные процессы в разбавленных водных растворах глицилтриптофана и воде // Биофизика. – 1998. – Т. 43. – в. 4. – С. 710 - 715.
5. Мартынюк В.С., Шадрина О.Г. Влияние переменного магнитного поля крайне низкой частоты на растворимость бензола в воде и растворах белка // Биомедицинская радиоэлектроника. – 1999. - № 2. – С. 56-60.
6. 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.
7. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. - М.:Наука, 1974. - 286с.
8. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – Киев:Наукова думка, 1981. – 208 с.
9. Ахрем А.А., Тищенко Е.И., Киселев П.А., Метелица Д.И. Спектральные характеристики взаимодействия *цитохрома с* и *гемоглобина* с метанололом и апилином // Биохимия. – 1978. – Т. 43. - в. 11. – С. 2033-2037.

Статья поступила в редакцию 08.01.2001