

УДК 577.322: 537.632.5

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АЛЬБУМИНА ПРИ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ГИДРОФОБНЫМИ ЛИГАНДАМИ

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

Введение

Согласно современным представлениям и результатам проведённых ранее исследований [1;2], водная фаза является важнейшим участником реакции биосистем различных иерархических уровней на воздействие электромагнитного поля (ЭМП) широкого частотно-амплитудного диапазона. Это может быть объяснено изменением гидрофобно-гидрофильного баланса в коллоидных системах вследствие преобразования структурно-функциональных свойств водных растворов, вызванного даже слабым воздействием [3]. Однако, если высокочастотные поля давно привлекают внимание как в теоретическом, так и в прикладном аспекте, то количество исследований, посвящённых полям крайне низкой частоты (КНЧ) и малой интенсивности, сравнительно невелико. В частности, большой интерес представляет выяснение механизмов воздействия ЭМП на конформационные переходы биополимеров, осуществляющиеся на молекулярном и клеточном уровне, в ходе их связывания с низкомолекулярными углеводородами и их галогенпроизводными гидрофобной природы [4].

Таким образом, целью настоящего исследования было изучение спектральных характеристик *сывороточного альбумина* при воздействии переменного магнитного поля (ПемП) КНЧ в условиях нагрузки белка гидрофобным лигандом – хлороформом.

Материалы и методы

В данном исследовании так же, как и в ряде предыдущих работ [1;5;6], в качестве базовой экспериментальной модели было использовано явление насыщения растворов белка низкомолекулярными лигандами гидрофобной природы. Материалом исследования служил коммерческий лиофильный препарат бычьего сывороточного альбумина, предназначенный для аналитических исследований.

Насыщение растворов альбумина концентрацией $1,75 \cdot 10^{-5}$ М/л хлороформом осуществляли в стеклянных бюксах путем наслаивания 3 мл раствора белка на 1,5 мл хлороформа с последующей инкубацией образцов при температуре 32 – 36°C. Инкубацию образцов проводили в течение 2, 4 и 24 часов, по окончании которой регистрировали дифференциальные спектры растворов альбумина, насыщенных хлороформом, против водных растворов чистого белка, экспонированного в тех же условиях, но без лиганда.

Для оценки влияния хлороформа на функциональную активность *сывороточного альбумина* использовали электрофоретический метод. Электрофорез проводили на пластинках в полиакриламидном геле, приготовленном по методу Девиса [7;8].

Импульсное магнитное поле создавали экспериментальной установкой, представляющей собой систему колец Гельмгольца. Импульсы были прямоугольной формы и разной полярности. Источником тока служил генератор сигналов специальной формы Г6-28. Частота магнитного поля составляла 8 Гц, индукция 25 мТ. Вектор индукции создаваемого магнитного поля колебался в направлении, параллельном вектору геомагнитного поля. Контроль параметров ПемП осуществляли с помощью микротесламетра Г-79. Опытные образцы помещали в экспериментальную установку. Измерение электромагнитного фона показало, что в месте расположения опытных образцов в кольцах Гельмгольца фоновые значения ПемП составляют 54 нТл, а в месте размещения контрольных образцов – 65 нТл. Для оценки возможного влияния различий в уровне фоновых ЭМП в местах расположения опытных и контрольных образцов проводили эксперименты с ложным воздействием ЭМП. В этом случае опытные образцы помещали в установку, но не подвергали воздействию ПемП.

Спектральные измерения проводили на спектрофотометре SPECTROMOM-195 в диапазоне длин волн $\lambda=230-310$ нм.

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

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены дифференциальные спектры *альбумина* в контрольных и экспериментальных условиях. Они свидетельствуют о том, что во всех случаях насыщение белка хлороформом приводит к двум спектральным сдвигам – чётко выраженному длинноволновому (“красному”) в области 235 – 250 нм, и менее выраженному – коротковолновому (“голубому”) – сдвигу в области 260-290 нм. В случае наложения магнитного поля первый спектральный сдвиг достоверно ($p < 0,05$) увеличивает свою амплитуду по абсолютным значениям, второй сдвиг практически не несёт на

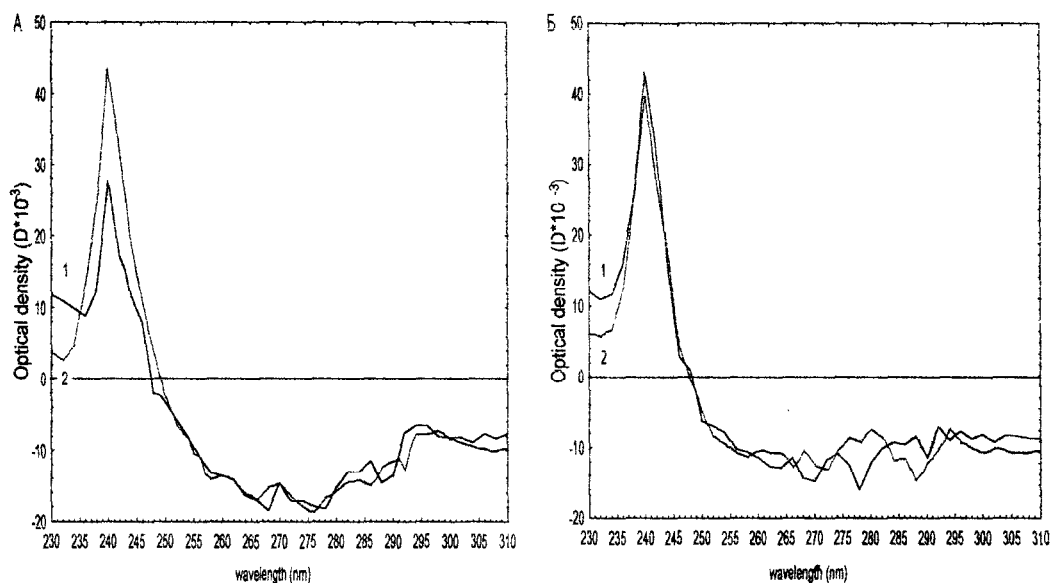


Рис. 1. Дифференциальные спектры растворов альбумина, насыщаемых хлороформом (А – опытная серия с наложением ПеМП; Б – серия с ложным воздействием МП)
1 – контрольная проба, 2 – проба, подвергаемая экспериментальному воздействию.

себе следов влияния ЭМП. В опытах с ложным воздействием подобного эффекта зарегистрировано не было.

Анализ дифференциальных спектров альбумина в процессе 24-часовой инкубации белка с хлороформом показал, что для двухчасовой экспозиции в магнитном поле характерна тенденция к увеличению длинноволнового сдвига. В целом с течением времени он теряет свою выраженность при одновременном общем усилении гипохромного эффекта, что может быть следствием частичного денатурирующего действия хлороформа, длительно контактирующего с альбумином.

Спектральные изменения, являющиеся результатом насыщения молекулы белка низкомолекулярным галогенпроизводным, позволяют говорить об изменении полярности как во внутренних областях макромолекулы, где находится основная масса ароматических аминокислотных остатков, так и на ее поверхности. Таким образом, можно предположить, что молекулы хлороформа взаимодействуют с альбумином, адсорбируясь на поверхности и проникая внутрь белковой глобулы. Увеличение “красного” сдвига при воздействии ПеМП указывает на ускорение связывания лиганда альбумином при действии данного фактора.

Как известно из литературных источников [9;10], низкомолекулярные

растворители, к числу которых относится и хлороформ, оказывают сильное денатурирующее действие на биополимеры. Однако в данной работе используются мягкие условия насыщения, при которых медленно устанавливается равновесие в системе хлороформ – вода – белок и происходит связывание хлороформа гидрофобными участками молекулы альбумина. Поэтому представляется важной оценка влияния хлороформа на структуру молекулы *сывороточного альбумина*. Интересен также вопрос об обратимости действия данного денатурирующего агента. В связи с этим проведены

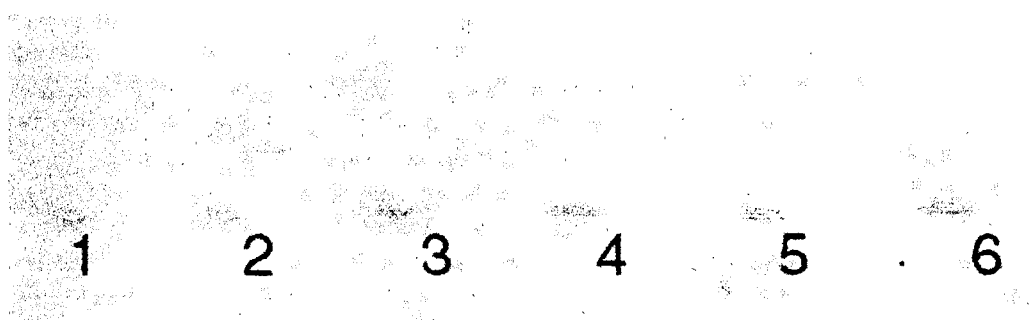


Рис.2. Электрофореграмма образцов *сывороточного альбумина* (1, 2, 3 – чистый белок; 4, 5, 6 – белок, инкубированный с хлороформом).

исследования электрофоретических свойств белка, насыщенного хлороформом.

На рисунке 2 представлена электрофореграмма нативного (1,2,3) и нагруженного хлороформом (4,5,6) *сывороточного альбумина*. Как видно, электрофоретическая подвижность белка, инкубированного с хлороформом, практически не изменяется. Данное явление воспроизводится во всех электрофоретических экспериментах. Это говорит о том, что насыщение *альбумина* хлороформом в относительно мягких условиях не приводит к изменению электрофоретической подвижности белковой молекулы, а, следовательно, не оказывает необратимого денатурирующего действия на структуру и функциональную активность изучаемого белка. Это подтверждает ранее установленный факт сохранения каталитической активности *цитохрома с* при его насыщении хлороформом в тех же самых условиях [1].

Выводы

1. Насыщение водного раствора *сывороточного альбумина* хлороформом сопровождается формированием “красного” сдвига в области 235 – 250 нм и

незначительных спектральных изменений в области поглощения ароматических аминокислотных остатков (260 – 290 нм), что свидетельствует о связывании хлороформа белковыми молекулами.

2. Воздействие ПемП не оказывает достоверного влияния на спектральные характеристики нативного *альбумина*.

3. Воздействие ПемП на растворы белка, насыщаемого хлороформом, приводит к достоверному увеличению длинноволнового сдвига в полосе 235-250 нм, что указывает на ускорение связывания лиганда *альбумином* при действии данного физического фактора.

4. Связывание хлороформа *альбумином* в мягких условиях не изменяет электрофоретические свойства белка, что указывает на отсутствие необратимых изменений пространственной структуры белковой глобулы при лигандировании низкомолекулярных галогенпроизводных, в частности хлороформа.

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 – 2002. – Т. 14. – Сер. “Биология” – №3. – С.121 –126.
2. Думанский Ю.Д., Сердюк А.М., Лось И.П. Влияние электромагнитных полей радиочастот на человека. – К.: Здоров’я, 1975. – 88 с.
3. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. – М.:Наука, 1974. – 286 с.
4. Кяйверайнен Л. И. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. – Л.: Наука, 1980. – 272 с.
5. 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 - 2000. - Т. 14. – Сер. “Биология”. – №2. – С. 89 – 93.
6. 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.
7. Devis V.I. Disc elektrophoresis. II Method and application to memon serum proteins.– Ann. N. York. – 1964. – Vol. – 121. – P. 104 – 427.
8. Cololnell K. C., Pigmon W. Disc elektrophoresis of humon solvia in polyocrylomite gel. – Arch. Biochem., Biophys. – 1965. – Vol.110. – P.91 – 96.
9. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – Киев : Наукова думка, 1981. – 208 с.
10. Черников В.Ф. Влияние некоторых физических факторов на колебания светорассеяния в воде и водных растворах биополимеров // Биофизика.-1998. – Т.43. – Вып. 5. – С. 711 – 715.

Поступила в редакцию 01.04.2003 г.