

**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 *C*, - 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 *C*, 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.

### **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 наслаивания 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, насыщенного 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  $\lambda_{\max} = 415$  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 С [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).

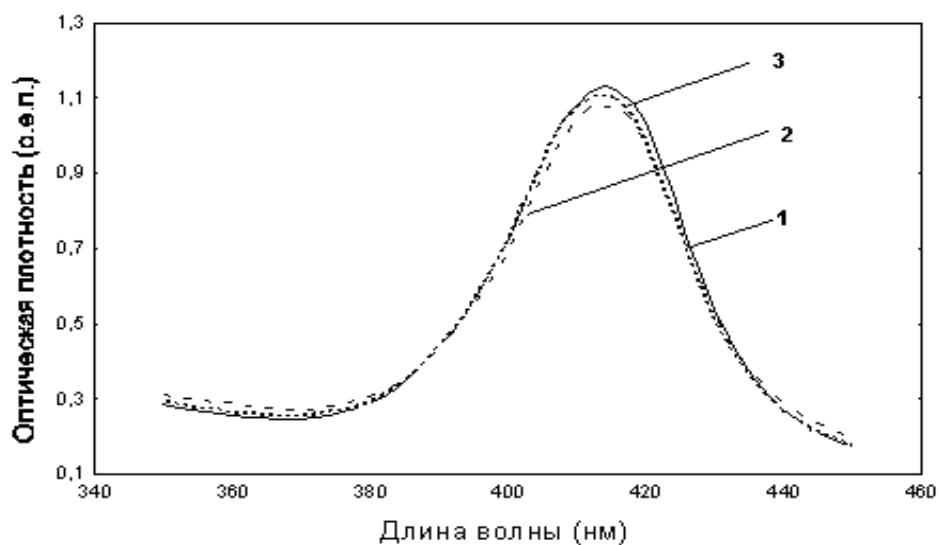


Рис 1. Интегральные спектры водных растворов гемоглобина через 2 часа инкубации:  
1- растворы чистого белка;  
2- растворы белка, инкубированного с хлороформом;  
3- растворы белка, инкубированного с бензолом.

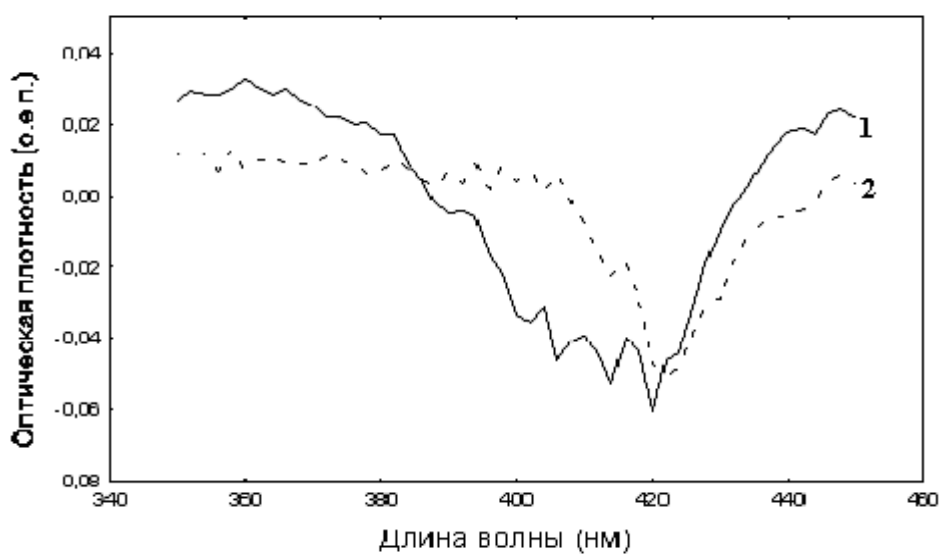


Рис. 2. Дифференциальные спектры водных растворов гемоглобина через 2 часа инкубации:  
1- растворы белка, инкубированного с хлороформом;  
2- растворы белка, инкубированного с бензолом.

**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>
$\lambda_{\text{max}}, \text{ нм}$	0,380±0,003	0,393±0,003
$\lambda_{\text{min}}, \text{ нм}$	0,418±0,001	0,420±0,002
$\lambda_{\text{min}}-\lambda_{\text{max}}, \text{ нм}$	0,033±0,003	0,026±0,002
$D_{\text{max}}-D_{\text{min}}, \text{ e.o.n.}$	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.*