

УДК 577.322: 537.632.5

## РЕНАТУРАЦИЯ МЕТГЕМОГЛОБИНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРОФОБНЫХ ЛИГАНДОВ

*Мартынюк В.С., Цейслер Ю.В., Мирошниченко Н.С.*

Экспериментальные данные по биологической активности микродоз факторов различной природы [1–3] однозначно свидетельствуют о высокой чувствительности живых систем к действию даже крайне слабых раздражителей [4 – 5]. Исследования влияния микродоз являются актуальными как в теоретическом плане, так и с точки зрения их практического применения в медицине, экспериментальной биологии и биотехнологии. Однако молекулярные механизмы действия низкоинтенсивных факторов различной природы остаются мало изученными.

Предполагается, что белки и вода являются одними из основных сенсоров сверхслабых воздействий. Однако данное предположение нуждается в серьезной экспериментальной проверке. Результаты ранее проведенных нами исследований на модели неспецифического связывания низкомолекулярных веществ неполярной природы с такими белками как цитохром с и сывороточный альбумин, свидетельствуют о том, что слабое магнитное поле крайне низкой частоты (МП КНЧ) изменяет структурно-функциональные свойства белков посредством влияния на гидрофобные взаимодействия. Широко известно, что гидрофобные взаимодействия играют ведущую роль в формировании пространственной укладки белков [6–7] при их синтезе в процессе ренатурации, а также в молекулярном распознавании структурно-модифицированных («дефектных») белковых молекул с целью их утилизации [8–9].

В связи с этим целью данной работы была разработка новой экспериментальной модели гидрофобных взаимодействий на примере ренатурации белка, т.е. самопроизвольного сворачивания белковой глобулы после её частичной денатурации в условиях нагрузки белка низкомолекулярными неспецифическими лигандами неполярной природы.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом модельного исследования служили 0,02%-е растворы лиофильного электрофоретически чистого препарата метгемоглобина крови быка (Fluka) с молекулярной массой 64 500 Да.

В качестве экспериментальной модели было использовано явление ренатурации белковых молекул после кислотной денатурации в сочетании с насыщением белка низкомолекулярными веществами гидрофобной природы, в частности хлороформом или бензолом. Метгемоглобин предварительно денатурировали посредством

добавления к 0,02%-м растворам белка 0,1 Н НСІ в соотношении 50:1 и регистрировали интегральные спектры биополимера (рис. 1, А). Сразу после добавления кислоты опытные пробы насыщали хлороформом и бензолом в стеклянных бюксах объёмом 5 мл путем наслаивания 3 мл раствора белка на 1,5 мл лиганда с последующей инкубацией образцов при комнатной температуре. Все пробы инкубировали в течение 1, 2, 4 и 24 часов, после чего растворы подвергали ренатурации с помощью добавления 0,1 мл 0,2 М фосфатного буфера рН=7,0. Процесс ренатурации регистрировали по увеличению оптической плотности метгемоглобина с момента начала нейтрализации рН растворов через каждые 20 мин на протяжении 2 часов на спектрофотометре СФ-16 при длине волны  $\lambda=408$  нм, которая соответствует пику  $S_{ore}$ , т.е. максимуму поглощения гема в метгемоглобине (рис.1, Б).

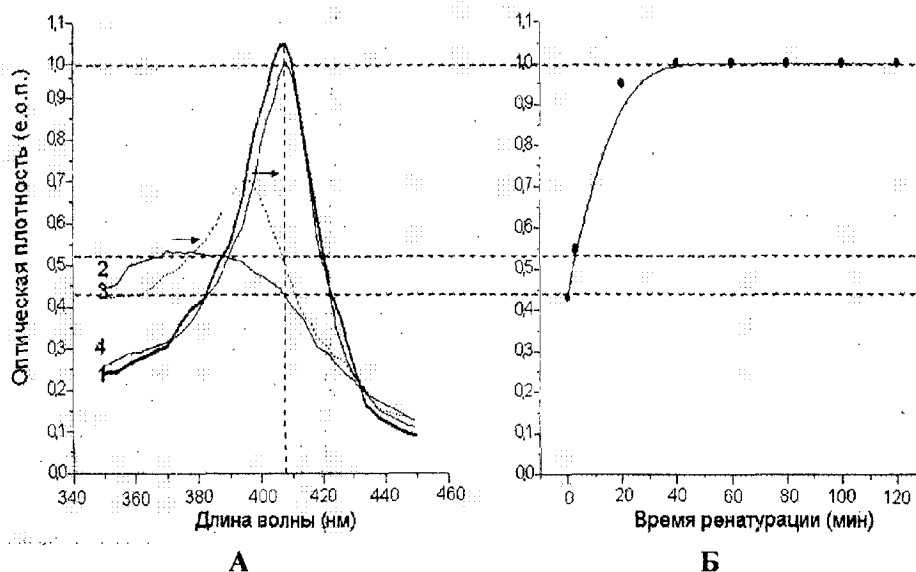


Рис. 1. Оптические спектры поглощения при различных структурных состояниях метгемоглобина (А) и кинетическая кривая ренатурации белка (Б): 1 – контрольный белок; 2 – денатурированный белок; 3 – переходная форма белка в процессе ренатурации через 3 минуты; 4 – ренатурированный белок.

Математический анализ полученных результатов исследования проводили в соответствии с общепринятыми правилами вариационной статистики. Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, А видно, что при кислотной денатурации метгемоглобина происходит существенное снижение оптической плотности в области пика  $S_{ore}$  ( $\lambda=408$  нм) в среднем на 50% вследствие смещения максимума поглощения в коротковолновую, «голубую», область на 28-30 нм (линия 2 на рис. 1, А). При нейтрализации рН раствора до специфических для белка значений (рН $\approx$ 7,0) он постепенно ренатурирует (линия 3 на рис. 1, А), что сопровождается почти полным

## РЕНАТУРАЦИЯ МЕТГЕМОГЛОБИНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРОФОБНЫХ ЛИГАНДОВ

возвратом его спектральных характеристик к исходным значениям (линия 4 на рис. 1, А) с незначительным снижением значений оптической плотности (гипохромный эффект) на 3-5% в области пика  $Soret$ . Таким образом, анализ спектров поглощения белка показывает, что разворачивание метгемоглобиновой глобулы, которое имеет место при данном виде денатурации, сопровождается раскрытием гидрофобных полостей макромолекулы и взаимодействием гема с полярными молекулами воды.

Нейтрализация pH раствора приводит к обратном процессу – ренатурации, т.е. сворачиванию денатурированных молекул с возвратом к исходным структурным и функциональным свойствам биополимера, что хорошо проявляется в оптических спектрах ренатурированного белка (линия 4 на рис. 1, А).

Анализ кинетических кривых показал, что процесс ренатурации метгемоглобина зависит от времени его кислотной денатурации в сочетании с инкубацией с гидрофобными лигандами (рис. 2). Чем дольше процесс инкубации с хлороформом и бензолом, тем ниже значения оптической плотности при выходе кинетических кривых на плато при ренатурации, что соответствует меньшему количеству молекул метгемоглобина, которые возвращается к своему первоначальному структурному состоянию. Это указывает на то, что хлороформ и бензол оказывают выраженное ингибирующее действие на процесс ренатурации белков.

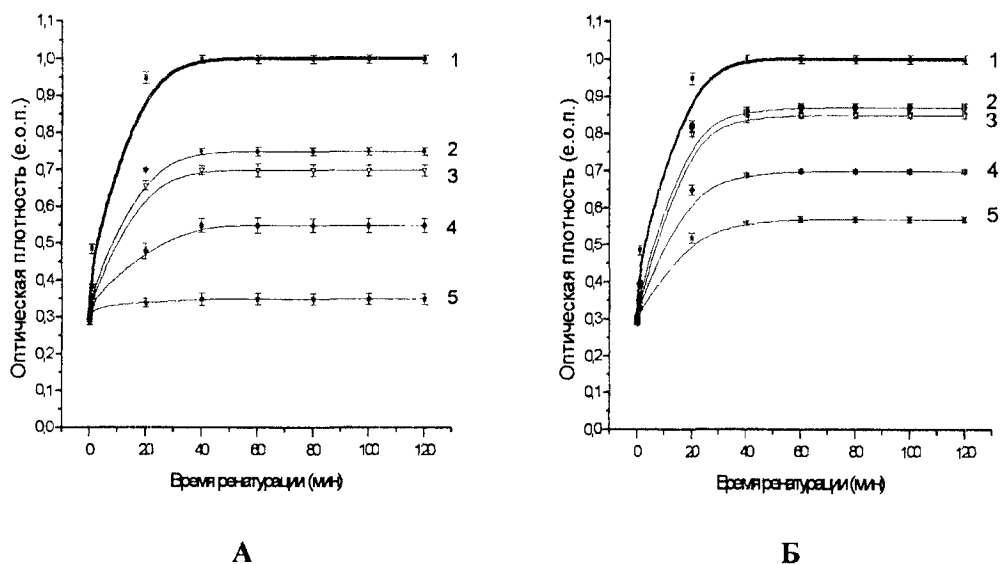


Рис. 2. Кинетические кривые метгемоглобина в процессе ренатурации после кислотной денатурации и взаимодействия с хлороформом (А) и бензолом (Б):

1 – белок, неподвергавшийся инкубации с лигандом; 2 – белок через 1 час инкубации; 3 – белок через 2 часа инкубации; 4 – белок через 4 часа инкубации; 5 – белок через 24 часа инкубации.

Сравнение интенсивности влияния используемых в эксперименте неспецифических гидрофобных лигандов на метгемоглобин показало, что хлороформ в

целом обладает большим денатурирующим действием в сравнении с бензолом. Это отражается, в первую очередь, в более низком уровне плато на кинетических кривых в процессе инкубации (рис. 2). Одновременно с этим кинетические кривые ренатурации белка после инкубации с бензолом выходят на плато на 20 минут позже, чем при взаимодействии с хлороформом, т.е. бензол контактирует и изменяет структуру молекулы метгемоглобина так, что замедляет процесс ренатурации. Таким образом, процесс восстановления пространственной структуры молекул метгемоглобина зависит от наличия в среде неспецифических низкомолекулярных веществ гидрофобной природы, при этом специфика влияния на процесс ренатурации определяется их химической природой.

Модель, разработанная в данном исследовании, может быть использована для дальнейшего изучения молекулярных механизмов влияния различных сверх слабых факторов, в том числе и МП КНЧ.

### ВЫВОДЫ

1. Хлороформ и бензол оказывают ингибирующее действие на ренатурацию метгемоглобина, при этом возврат в исходное структурное состояние белка после его кислотной денатурации зависит от времени инкубации белка с данными низкомолекулярными неспецифическими гидрофобными лигандами.

2. В процессе ренатурации метгемоглобина влияние хлороформа характеризуется более выраженным денатурирующим эффектом, тогда как действие бензола проявляется в замедлении выхода кинетических кривых на плато.

### Список литературы

1. Бурлакова Е.Б. Эффекты сверхмалых доз // Вестник РАН. – 1994. – Т. 64, № 5. – С. 425-434.
2. Кисловский Л. Д. Реакция биологической системы на адекватные ей слабые низкочастотные электромагнитные поля // Проблемы космической биологии. – 1992. – Т. 431. – С. 148-165.
3. Гатовский С.И., Перов Ю.В. Особенности биологического действия физических факторов малый и сверх малых интенсивностей и доз. – М.: «ИМЕДИС», 2000. – 192 с.
4. Lednev V. V. Electric field ion cyclotron resonance // Bioelectromagnetics. – 1997. – V. 18. – P. 85-87.
5. Владимирский Б. М., Темурьянц Н. А., Мартынюк В. С. Космическая погода и наша жизнь. – Фрязино: Изд-во «Век 2», 2004. – 224 с.
6. Мартынюк В. С., Калиновский П. С., Цейслер Ю. В. Влияние слабого магнитного поля крайне низкой частоты на спектральные характеристики цитохрома С в присутствии хлороформа // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология» – 2001. – Т. 14., №3. – С. 121-126.
7. Мартынюк В.С., Цейслер Ю.В., Калиновский П.С. Влияние электромагнитного поля крайне низкой частоты на конформационное состояние сывороточного альбумина при его насыщении хлороформом // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – Т. 7, № 1. – С. 86-91.
8. Aaron Ciechanover. The ubiquitin – proteasome pathway: on protein death and cell life. // EMBO Journal. – 1998 – V. 17, № 24. – P. 7151-7160.
9. Jeffrey D. Laney and Mark Hochstrasser. Substrate targeting in the ubiquitin system. Cell. – 1999 – V. 97 – P. 427-430.

Поступила в редакцию 13.10.2005 г.