

УДК 577.115.3: 591

ВЛИЯНИЕ ХЛОРОФОРМА И БЕНЗОЛА НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА

Гидулянов А.А., Жданова Е.Г

Загрязнения окружающей среды современных промышленных городов представляют собой многокомпонентные смеси ксенобиотиков, поступающих в организм человека с атмосферным воздухом, питьевой водой [1, 2]. Повышение качества воды, используемой населением в хозяйственно-питьевых целях, является важнейшей задачей гигиены питьевого водоснабжения [3, 4].

Увеличение содержания органических соединений в объектах окружающей среды, важнейшей особенностью которых является липофильность, позволяет им в значительной мере накапливаться и концентрироваться в живых организмах даже при незначительном содержании в окружающей среде [5].

В настоящее время большое внимание уделяется потенциальной опасности хлорорганических соединений, образующихся на различных этапах очистки и обеззараживания питьевой воды на водопроводных станциях. В наибольших количествах образуется хлороформ, для которого не установлена научно обоснованная ПДК в питьевой воде [6, 7]. Органические вещества широко используются в качестве растворителей. Среди таких веществ – хлороформ и бензол [2, 8, 9].

Проблема влияния хлороформа и бензола на живые организмы в последнее время привлекает все большее внимание. Известны системные и клеточные механизмы токсического действия, однако молекулярные механизмы мало изучены. Нарушения в нормальном функционировании живых организмов заставляют задуматься о механизмах действия указанного фактора, реализующихся на молекулярном и клеточном уровнях и связанных с изменениями структуры биологических молекул, а, следовательно, и с выполняемыми ими функциями [10, 11].

Поэтому гигиеническая оценка хлороформа и бензола и выяснение механизмов его воздействия на живые организмы остается немаловажной задачей биологии и медицины.

В частности большой интерес представляет выяснение механизмов воздействия низкомолекулярных углеводов и их галогенпроизводных гидрофобной природы на конформационные переходы биополимеров, осуществляющиеся на молекулярном и клеточном уровне.

Выяснение механизма взаимодействия гидрофобных низкомолекулярных веществ с белками требует проведения исследований на белковых моделях с использованием разных веществ гидрофобной природы [12, 13].

В связи с этим целью данной работы было проведение сравнительного анализа влияния хлороформа и бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служил гемолизат эритроцитов крови человека, как модельный раствор гемоглобина. Гемолизат получали методом "осмотического шока". После этого в полученный гемолизат добавляли дистиллированную воду до конечной концентрации гемоглобина 0,03% [14].

Раствор белка насыщали бензолом и хлороформом в стеклянных бюксах объёмом 5 мл путем наслаивания 3 мл раствора белка на 1,5 мл лиганда с последующей инкубацией образцов при комнатной температуре. Инкубацию образцов проводили в течение 1, 2, 4 и 24 часов.

Электрофорез проводили в пробочках в 7% ПААГ. Разделение проводили при 250-340 В при силе тока 2-5 мА на каждую трубку. Продолжительность разделения составляла 2,5-3 часа [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Низкомолекулярные растворители, к числу которых относится хлороформ и бензол, оказывают сильное денатурирующее действие на биополимеры. Однако в данном исследовании использовали насыщения гемоглобина, при которых медленно устанавливается равновесие в системе хлороформ (бензол) - вода-белок и происходит связывание лигандов гидрофобными участками молекулы белка. Возникает естественный вопрос о том, какое влияние на структуру белка оказывает связывающийся с ним хлороформ и бензол. Поэтому представляется важным оценка влияния углеводов на структуру молекулы гемоглобина и обратимость действия данных денатурирующих агентов. В связи с этим проведены исследования электрофоретических свойств белка, насыщенного хлороформом и бензолом.

Как видно из таблицы 1 и рисунков 1, 2, 3 в случае связывания хлороформа с гемоглобином наблюдается достоверное снижение электрофоретической подвижности ($p < 0,05$).

Электрофоретическая подвижность первой фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом по сравнению с нативным гемоглобином уменьшилась в 1 час на 11%, во 2 час увеличилась на 2,8%, в 4 час уменьшилась на 22%. Как видно, в случае связывания хлороформа с белком, при 24-часовой экспозиции 1 фракция не идентифицирована.

Электрофоретическая подвижность второй фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом, по сравнению с нативным гемоглобином, уменьшилась в 1 час на 17%, во 2 час - на 5%, в 4 час - на 20% и 24 час - на 14%.

Электрофоретическая подвижность третьей фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом по сравнению с нативным гемоглобином уменьшилась в 1 час на 34%, во 2 час - на 16%, в 4 час - на 42% и 24 час - на 18%.

Таблица 1.
Изменение электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием хлороформа
($\bar{x} \pm S \bar{x}$, R_p)

Время экспозиции (час)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с хлороформом
1	1	0,73±0,05	0,65±0,03
	2	0,65±0,03	0,54±0,03*
	3	0,59±0,02	0,39±0,01*
2	1	0,71±0,05	0,73±0,04
	2	0,61±0,03	0,58±0,03
	3	0,49±0,02	0,41±0,02*
4	1	0,73±0,05	0,57±0,03*
	2	0,65±0,03	0,51±0,03*
	3	0,59±0,02	0,34±0,02*
24	1	0,75±0,05	–
	2	0,67±0,03	0,58±0,02*
	3	0,6±0,02	0,49±0,02*

Примечание: * – достоверность различий показателей по сравнению с контрольными образцами (p<0,05).

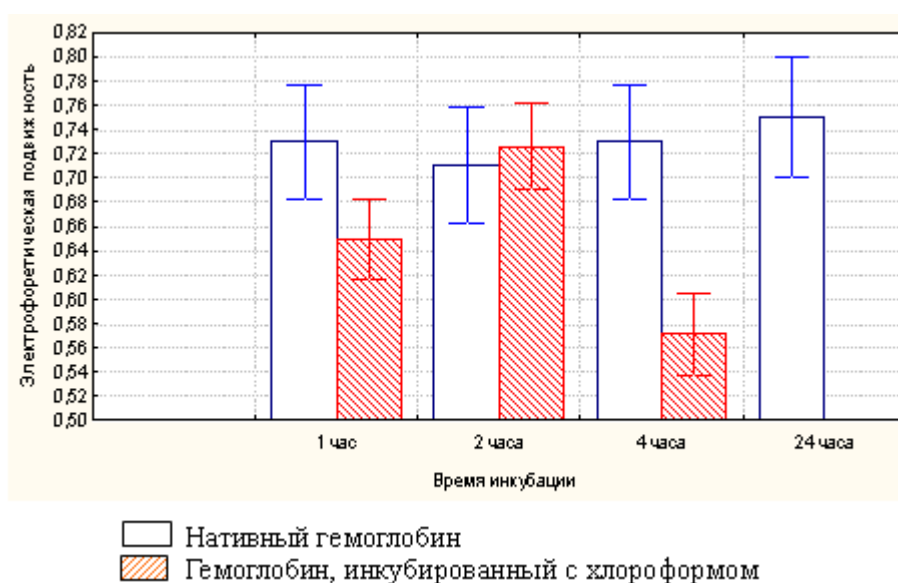


Рис. 1. Электрофоретическая подвижность 1 фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРОФОРМА И БЕНЗОЛА

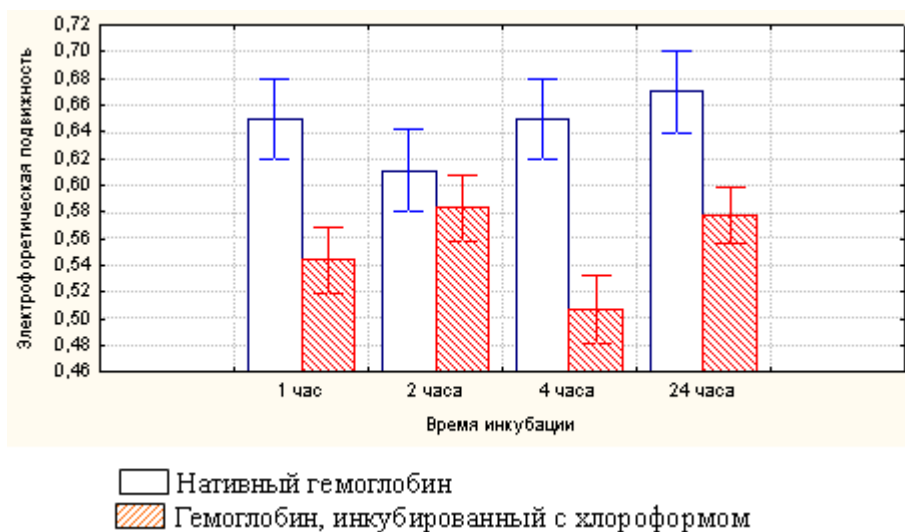


Рис. 2. Электрофоретическая подвижность 2 фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

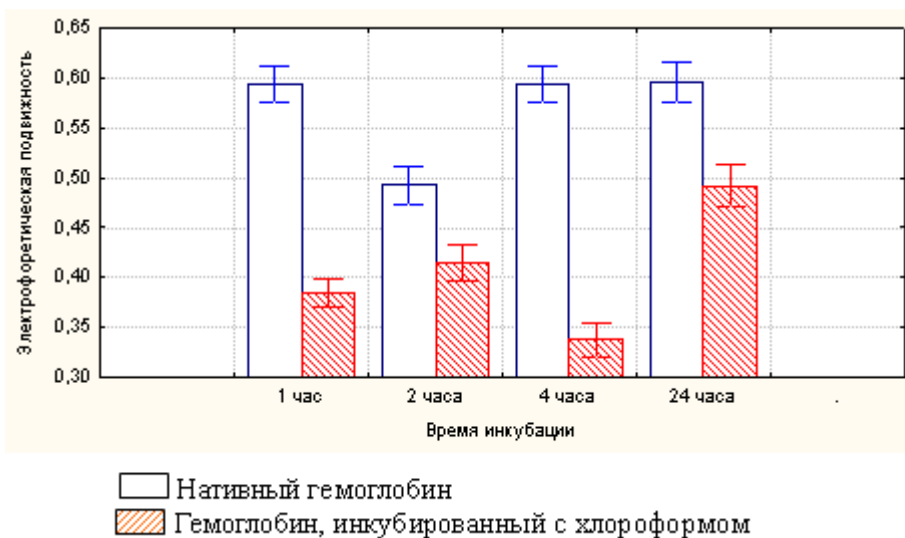


Рис. 3. Электрофоретическая подвижность 3 фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

Практически во всех 4 экспозициях в случае связывания хлороформа с гемоглобином, наблюдается достоверное снижение электрофоретической подвижности. Увеличение электрофоретической подвижности первой фракции гемоглобина во второй час по сравнению с нативным гемоглобином недостоверны ($p > 0,05$). Во всех поставленных экспериментах при 24-часовой экспозиции происходила денатурация гемоглобина, были видны хлопьяподобные структуры.

При анализе электрофоретической подвижности взаимодействия белковых молекул с хлороформом, т.е. за все время экспозиции, наиболее выраженные изменения электрофоретической подвижности наблюдаются в 4-ый час.

Полученные данные о влиянии бензола на электрофоретическую подвижность гемоглобина представлены в таблице 2 и на рисунках 4, 5, 6.

Таблица 2.
Изменение электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием бензола
($\bar{x} \pm S\bar{x}$, Rf)

Время экспозиции (час)	Фракции	Контрольные образцы	Взаимодействие с бензолом
1	1	0,73±0,05	0,58±0,03*
	2	0,65±0,03	0,58±0,02*
	3	0,59±0,02	0,50±0,02*
2	1	0,71±0,05	0,63±0,03*
	2	0,61±0,03	0,56±0,02
	3	0,49±0,02	0,43±0,01*
4	1	0,73±0,05	0,56±0,03*
	2	0,65±0,03	0,51±0,02*
	3	0,59±0,02	0,4±0,03*
24	1	0,75±0,05	–
	2	0,67±0,03	0,61±0,02
	3	0,6±0,02	0,54±0,01*

Примечание: * – достоверность различий показателей по сравнению с контрольными образцами (p<0,05).

Как следует из данных таблицы 2 и рисунков 4, 5, 6 в случае связывания гемоглобина с бензолом, наблюдается снижение электрофоретической подвижности. Электрофоретическая подвижность первой фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом, по сравнению с нативным гемоглобином, уменьшилась в 1 час на 21%, во 2 час - на 12%, в 4 час - на 23%. Как видно в случае связывания бензола с белком при 24-й экспозиции 1 фракция не идентифицирована.

Электрофоретическая подвижность второй фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом, по сравнению с нативным гемоглобином, уменьшилась в 1 час на 11%, во 2 час - на 8%, в 4 час - на 22% и 24 час - на 9%.

Электрофоретическая подвижность третьей фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом, по сравнению с нативным гемоглобином, уменьшилась в 1 час на 15%, во 2 час - на 12%, в 4 час - на 32% и 24 час - на 10%.

Практически во всех 4 экспозициях в случае связывания бензола с гемоглобином наблюдается достоверное снижение электрофоретической подвижности (p<0,05). При анализе электрофоретической подвижности взаимодействия белковых молекул с бензолом, т.е. за все время экспозиции, наиболее выраженные изменения электрофоретической подвижности наблюдаются в 4-ый час.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРОФОРМА И БЕНЗОЛА

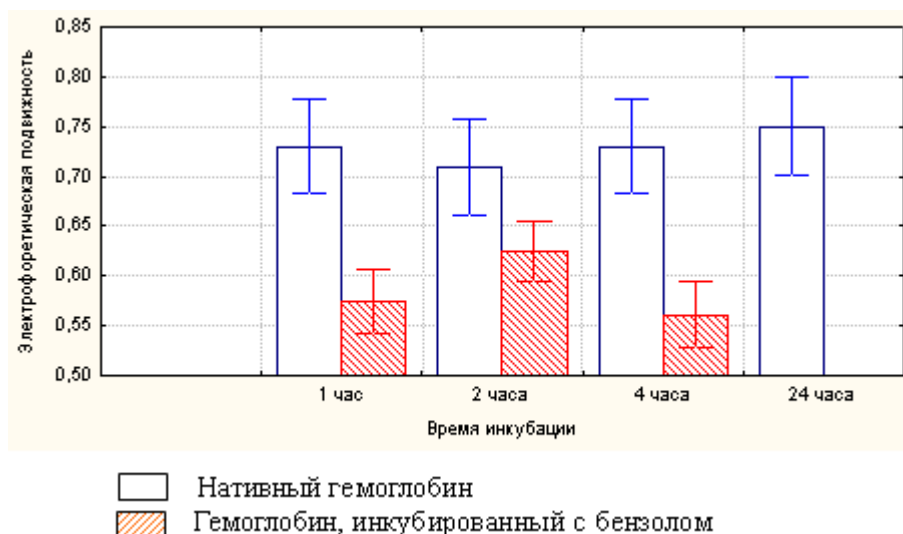


Рис. 4. Электрофоретическая подвижность 1 фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

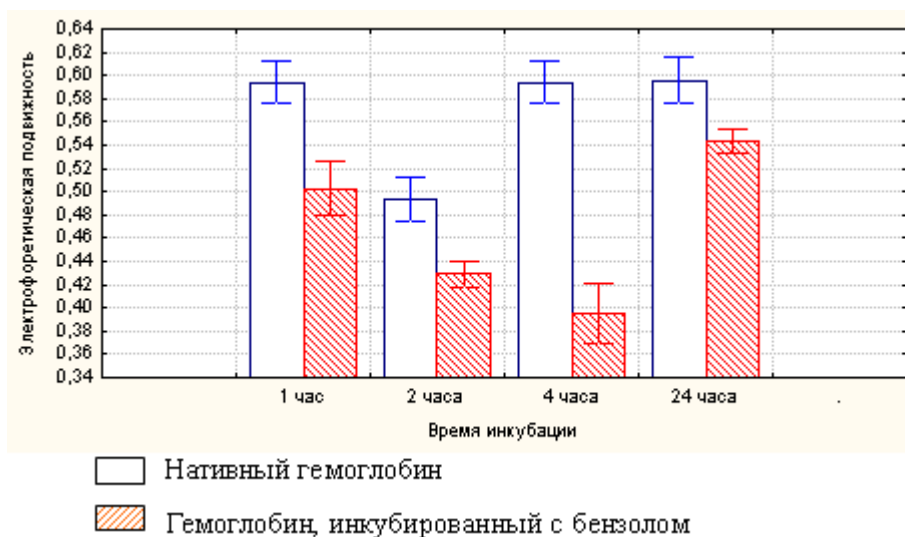


Рис. 5. Электрофоретическая подвижность 2 фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

Данные явления воспроизводятся во всех электрофоретических экспериментах, как при инкубации гемопротеида с хлороформом, так и при инкубации с бензолом. Это позволяет выдвинуть предположение о том, что насыщение гемоглобина, как хлороформом, так и бензолом оказывает денатурирующее действие на структуру изучаемого белка.

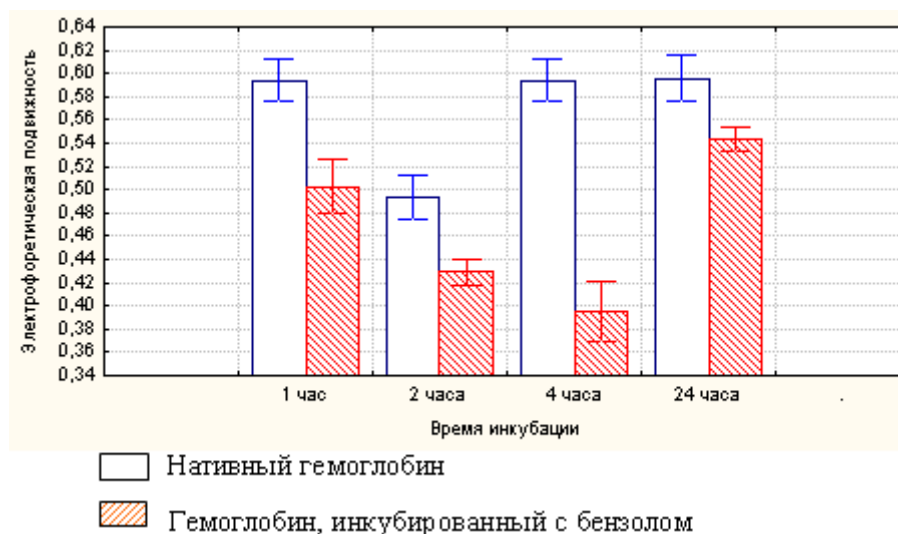


Рис. 6. Электрофоретическая подвижность 3 фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

Можно предположить возможность образования полимерных форм белка, что свидетельствует об усилении агрегации белковых молекул, о чем свидетельствует более плотная окраска исследуемого белка.

Образование полимеров зависит от дисульфидных мостиков S-S за счет SH-группы. SH-группы, входящие в состав гемоглобина, по одной α -цепи и по две в β -цепи, играют весьма существенную роль в выполнении основной функции гемоглобина [16]. При взаимодействии лигандов с белком возможно происходит изменение заряда белка, в следствии лиганд-индуцированных конформационных изменений полипептидной цепи, приводящих к соответствующим изменениям в пространственном расположении аминокислотных радикалов.

Как видно из таблицы 3 и рисунков 7, 8, 9 при сравнении электрофоретической подвижности гемоглобина, инкубированного с бензолом и хлороформом, оба денатурирующих агента оказывают равнозначное воздействие на гемопротеид.

Электрофоретическая подвижность первой фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом, по сравнению с гемоглобином, взаимодействующим с бензолом, была выше в 1 час на 12%, во 2 час на 14%, в 4 час на 2%. При 24 часовой экспозиции 1 фракция не идентифицирована.

Электрофоретическая подвижность второй фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом, по сравнению с гемоглобином, взаимодействующим с бензолом в 1 час была меньше на 7%, во 2 час была больше на 4%, в 4 час на 2% и через 24 часа инкубации была меньше на 5%.

Электрофоретическая подвижность третьей фракции гемоглобина при взаимодействии с хлороформом, по сравнению с гемоглобином, взаимодействующим с бензолом в 1 час была меньше на 22%, во 2 час на 5%, в 4 час на 15% и через 24 часа инкубации на 9%.

Таблица 3.

Изменения электрофоретической подвижности гемоглобина под влиянием хлороформа и гемоглобина под влиянием бензола ($\bar{x} \pm S \bar{x}$, R_f)

Время экспозиции (час)	Фракции	Взаимодействие с бензолом	Взаимодействие с хлороформом
1	1	0,58±0,03	0,65±0,03
	2	0,58±0,02	0,54±0,03
	3	0,50±0,02	0,39±0,01*
2	1	0,63±0,03	0,73±0,04*
	2	0,56±0,02	0,58±0,03
	3	0,43±0,01	0,41±0,02
4	1	0,56±0,03	0,57±0,03
	2	0,51±0,02	0,52±0,03
	3	0,4±0,03	0,34±0,02
24	1	–	–
	2	0,61±0,02	0,58±0,02
	3	0,54±0,01	0,49±0,02*

Примечание: * – достоверность различий показателей электрофоретической подвижности гемоглобина взаимодействующего с хлороформом относительно гемоглобина взаимодействующего с бензолом.

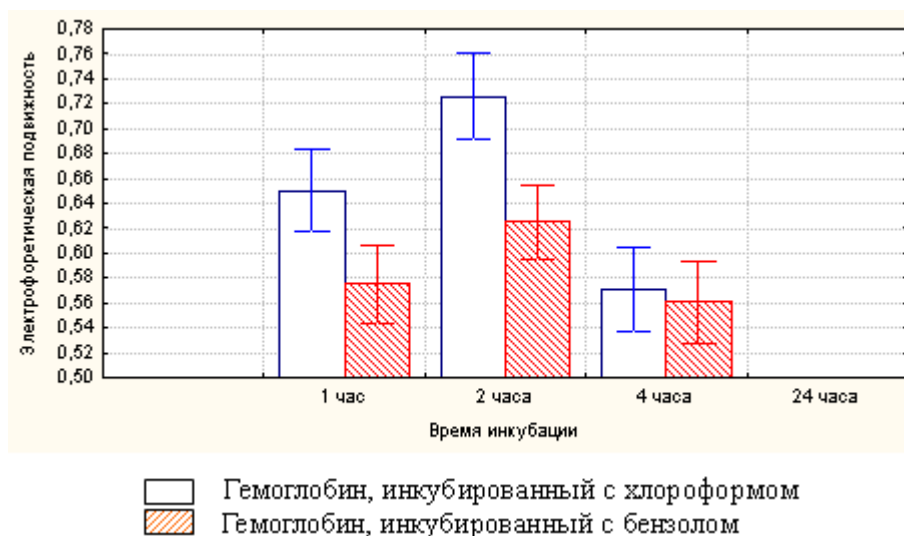


Рис. 7. Электрофоретическая подвижность 1 фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом и хлороформом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что как бензол, так и хлороформ являются равнозначными денатурирующими агентами. Сложно оценить степень различий их воздействия, поскольку изменение электрофоретической подвижности фракций гемоглобина под их влиянием находится практически на одном уровне.

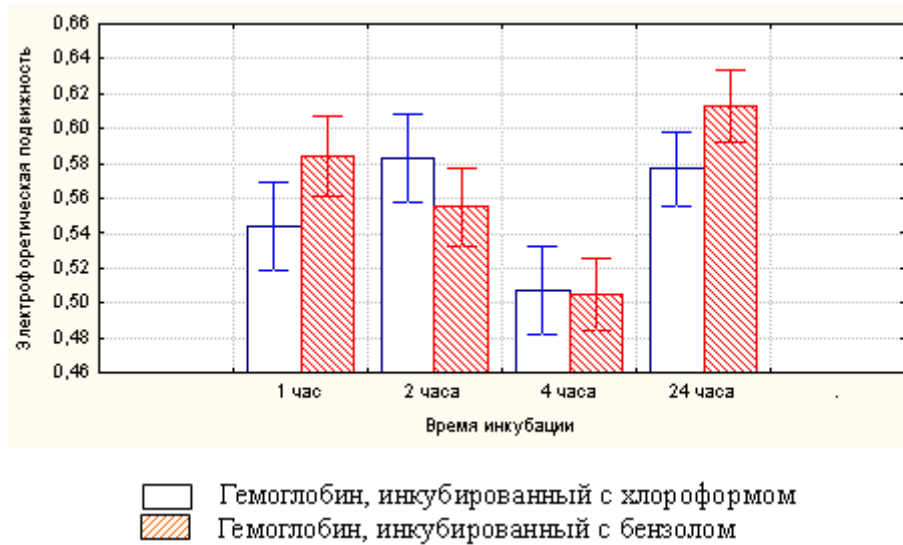


Рис. 8. Электрофоретическая подвижность 2 фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом и хлороформом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

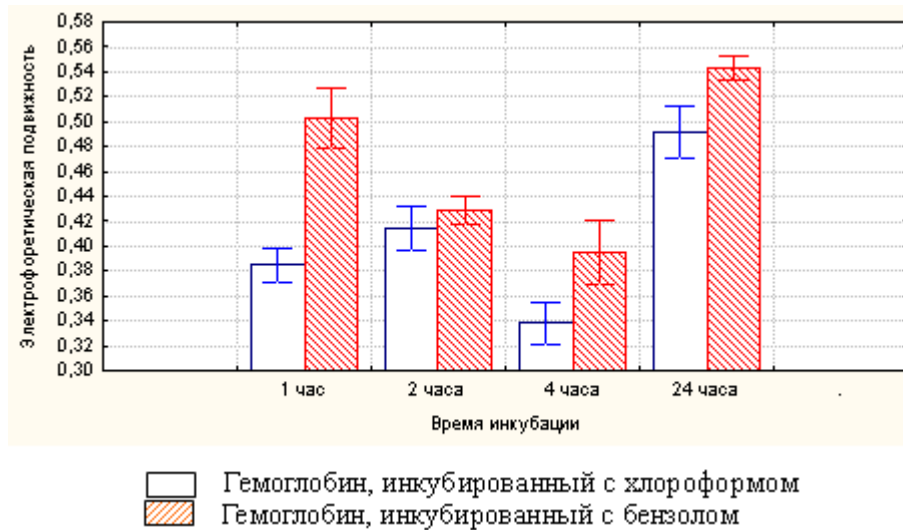


Рис. 9. Электрофоретическая подвижность 3 фракции гемоглобина при взаимодействии с бензолом и хлороформом через 1, 2, 4, 24 часа инкубации.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что насыщение гемоглобина хлороформом и бензолом сопровождается снижением электрофоретической подвижности гемоглобина, что свидетельствует об их денатурирующем эффекте.

2. Показано, что хлороформ и бензол обладают сходным денатурирующим эффектом, что выражается в близкой электрофоретической подвижности фракций гемоглобина, инкубированных с изученными углеводородами.

Список литературы

1. Безуглая Э. Ю. Метеорологический потенциал и климатические особенности загрязнения воздуха городов. – Л.: Гидрометеиздат, 1980. – С. 184.
2. Бонашевская Т.И., Пинигин М.А. Морфологическая оценка изолированного и сочетающего действия химических и физических факторов окружающей среды // Гигиена и санитария. – 1991. – № 2. – С. 54.
3. Красовский Г.Н., Ильницкий А.П., Воронин В.М. Обоснование предельно допустимой концентрации хлороформа в питьевой воде // Гигиена и санитария. – 1991. – №2. – С. 14-15.
4. Скворцов А.Ф., Сергеев Э.П., Елаховская Н.Г. К гигиенической оценке содержания хлороформа в питьевой воде // Гигиена и санитария. – 1983. – №3. – С. 10-13.
5. Савенко В. С. Природные и антропогенные источники загрязнения атмосферы. – М.: Наука, 1991. – С. 191-207.
6. Жиряков В.Г. Органическая химия. – М.: Издательство «ХИМИЯ», 1978. – 407 с.
7. Красовский Г. Н., Егорова Н.А. Хлорирование воды как фактор повышенной опасности для здоровья населения // Гигиена и санитария. – 2003. – № 1. – С. 140.
8. Воронин В.М., Литвинов Н.Н., Казачков В.И. Изучение канцерогенности хлороформа // Вопросы онкологии. – 1987. – Т. 33, № 8. – С. 81-85.
9. Лазарева Н. В, Левина Э. Н. Вредные вещества в промышленности. – М.: Наука, 1976. – С. 272-274.
10. Васьковская Л. Ф. Циркуляция и трансформация хлорфосфатов, ртутьпроизводных препаратов в системе окружающая среда биологический объект. – К.: Наукова думка, 1985. – С. 156.
11. Лукьянчук В.Д. Молекулярные механизмы взаимодействия сывороточного альбумина с динитрокрезолом // Вопросы медицинской химии. – 1983. – № 2. – С. 8-12.
12. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. – М.: Наука, 1974. – 329 с.
13. Кяйвярайнен А.И. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. – Л.: Наука, 1980. – 272 с.
14. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // Arch. Biochem. – 1949.– V.21 – P.224 – 226.
15. Гааль Э, Медыша Г, Верещкий А. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 446 с.
16. Рубина Х.М. Физиология системы крови. Физиология эритропоэза. – Л.: Наука, 1979. – С. 211-232.

Поступила в редакцию 20.10.2006 г.