

ИЗМЕНЕНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ОКСИГЕМОГЛОБИНА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ

© 2001 г. Т. Ю. Федотова, Г. А. Вашанов, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

С использованием метода ИК-спектрофотометрии установлено, что ДСН вызывает ра-зупорядочивание вторичной структуры гемоглобина и индуцирует скрытые повреждения макромолекул, выявляемые при действии УФ-света.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем современной биологической науки является изучение состояния биологических систем в условиях все более усугубляющейся неблагоприятной экологической ситуации. Загрязнение окружающей среды токсическими продуктами химических производств приводит к возникновению в живых организмах различного рода патологий, выяснение молекулярных механизмов которых и представляет интерес для исследователей. Важную роль среди антропогенных поллютантов играют поверхностно-активные вещества, в частности додецилсульфат натрия (ДСН), производство которых в последнее время существенно возросло из-за широкого их использования в быту и промышленности. Так как в ответной реакции организмов на воздействие физико-химических факторов первостепенное значение имеют белковые структуры, особую актуальность приобретает исследование их структурно-функциональных свойств в присутствии данного класса соединений.

В связи с вышеизложенным нами были изучены свойства ключевого белка системы крови – гемоглобина эритроцитов, участвующего в транспорте кислорода, модифицированного додецилсульфатом натрия различных концентраций. Данный гембелок является удобной моделью для изучения действия различных физико-химических агентов на белки, в частности, на ферменты, поскольку простетическую группу этого гемопротеида – гем – можно рассматривать как аналог их активного центра. Полная идентификация первичной структуры гемоглобина и взаимного расположения атомов в его молекуле позволяет соотносить выявленные изменения функциональных свойств с конкретными конформационными перестройками отдельных аминокислотных остатков.

В более ранних исследованиях нами показана существенная потеря функциональной активности оксигемоглобина человека, вызванная уже домицеллярными концентрациями ДСН [1]. Встраиваясь в

гемовый карман белка, детергент индуцирует внутримолекулярные перестройки, приводящие к неспособности гемоглобина связывать кислород и переходу его в дезоксиформу. Однако важным представляется выяснение участия в ответной реакции молекул гемоглобина на воздействие додецилсульфата натрия различных уровней их структурной организации. Определяющей с точки зрения формирования функционально-активной конформации является вторичная структура.

Одним из наиболее чувствительных методов для определения типа и относительного количества элементов вторичной структуры белков является регистрация их спектров поглощения в инфракрасной области [2]. Инфракрасная спектроскопия широко применяется как в аналитических целях, так и в тонких структурных исследованиях. Несмотря на то, что интерпретация спектров полимеров – сложная задача, ИК-анализ дает возможность оценить групповые движения в молекуле, связанные с различными характеристическими частотами при изменении внутримолекулярного окружения группы. К настоящему времени накоплен достаточно обширный материал по ИК-спектроскопии различных полипептидов и белков. В частности, на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ проводились исследования спектральных характеристик в инфракрасной области лактатдегидрогеназы, каталазы, гемоглобина, модифицированных различного рода внешними воздействиями [3]. Настоящая работа посвящена изучению вторичной структуры гемоглобина в нативном состоянии и после модификации ДСН методом ИК-спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали растворы оксигемоглобина ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в 0,5 % растворе хлорида натрия, выделенного из донорской крови по методу Д.А.Драбкина с модификациями Л.А.Блюменфельда [4]. Растворы модификатора готовили из кристаллических коммерческих препаратов («Serva», Германия),

концентрация ДСН составляла $5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Образцы свободного и модифицированного гемоглобина высушивали в термостате при 36 °С в течение 18 ч. Для анализа использовали таблетки, приготовленные методом прессования с избытком KBr, предварительно просушенном при 150 °С в течение 24 ч. Масса наполнителя для навески составляла 8 мг, исследуемого образца 1 мг. Смесь KBr и изучаемого препарата подвергали измельчению на вибраторе фон Ардена в течение 4 мин. Полученную порошкообразную смесь массой 2 мг использовали для приготовления таблетки. Далее осуществляли вакуумирование пресс-формы до давления 133 Па в течение 2 мин и производили 5-минутное прессование ручным прессом с усилием 600 МПа. Полученные таблетки хранили на открытом воздухе не более 15 мин. Во время приготовления таблеток и регистрации ИК-спектров относительная влажность воздуха в лаборатории не превышала 75 %. Регистрацию ИК-спектров осуществляли на спектрофотометре «Specord-M80» в диапазонах 1800 – 900 см^{-1} и 1540 – 1350 см^{-1} . Интервал между точками измерения составлял 4 см^{-1} , время интегрирования измерения каждой точки – 3 и 5 с соответственно. Соотношение максимумов поглощения измеряли в полосе амид I на частотах 1685, 1656, 1650, 1630 см^{-1} , в полосе амид II – на 1550, 1535, 1516 см^{-1} . Время измерения значений оптической плотности на указанных частотах соответствовало 30 с.

УФ-облучение образцов проводили с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 в термостатированной кювете с непрерывным перемешиванием при 37 °С. Интенсивность облучения на расстоянии от оси лампы 23 см составляла 1501 Дж/м²·мин. Для выделения ультрафиолетовой составляющей спектра излучения лампы использовали светофильтр УФС-1 с полосой пропускания в области 240 – 400 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных экспериментов установлено, что при отношении компонентов в системе белок –

модификатор 1:1, 1:5, 1:10 изменения спектральных свойств образцов по сравнению с нативным гемоглобином не происходит (табл. 1).

При этом соотношение интенсивности полос поглощения при 1656 см^{-1} (беспорядочная структура) к 1650 см^{-1} (α -спираль), 1535 см^{-1} (беспорядочная структура) к 1516 см^{-1} (α -спираль) достоверно не изменялось и составляло соответственно $1,017 \pm 0,005$; $1,076 \pm 0,019$ (нативный белок), $1,018 \pm 0,002$; $1,046 \pm 0,008$ (1:1), $1,019 \pm 0,009$; $1,053 \pm 0,005$ (1:5), $1,014 \pm 0,005$; $1,058 \pm 0,006$ (1:10). Соотношение интенсивности полос поглощения при 1630 см^{-1} , 1685 см^{-1} (β -складчатость) к 1656 см^{-1} (α -спираль) и 1550 см^{-1} (β -складчатость) к 1535 см^{-1} (α -спираль) также не выявило достоверных отличий по сравнению с немодифицированным гемоглобином и составило $0,890 \pm 0,017$; $0,892 \pm 0,022$; $1,046 \pm 0,019$ (нативный белок), $0,916 \pm 0,004$; $0,900 \pm 0,011$; $1,039 \pm 0,003$ (Hb:ДСН=1:1), $0,902 \pm 0,035$; $0,891 \pm 0,003$; $1,044 \pm 0,003$ (1:5), $0,904 \pm 0,017$; $0,901 \pm 0,006$; $1,071 \pm 0,012$ (1:10) соответственно. При увеличении концентрации детергента в системе наблюдаются статистически достоверное уменьшение соотношения интенсивности полос поглощения при 1535 см^{-1} (беспорядочная структура) к 1516 см^{-1} (α -спираль): $1,038 \pm 0,002$ (1:25) и $1,039 \pm 0,002$ (1:50), что свидетельствует об увеличении вклада α -спирали. При соотношении молекул белок – модификатор 1:100 обнаружено возрастание величины отношения интенсивности поглощения при 1630 см^{-1} (β -складчатость) к 1656 см^{-1} (α -спираль): $0,939 \pm 0,004$. Соотношение интенсивности полос поглощения при остальных вышеуказанных частотах статистически достоверно не отличается от нативного гемоглобина.

При действии максимальной из использованных концентрации ДСН (Hb:ДСН =1:100) наблюдается уменьшение интенсивности поглощения в полосах амид I, амид II и в пике при 1405 см^{-1} , одновременно появляется максимум поглощения при 1477 см^{-1} ,

Таблица 1

Изменение соотношения интенсивностей полос поглощения в ИК-спектрах свободного и модифицированного ДСН оксигемоглобина

Отношение частот (см^{-1})	Соотношение молекул белок – модификатор (Hb:ДСН)						
	без ДСН	1:100	1:50	1:25	1:10	1:5	1:1
1656/1650	$1,017 \pm 0,005$	$1,012 \pm 0,007$	$1,029 \pm 0,029$	$1,023 \pm 0,023$	$1,014 \pm 0,005$	$1,019 \pm 0,009$	$1,018 \pm 0,002$
1535/1516	$1,076 \pm 0,019$	$1,061 \pm 0,015$	$1,039 \pm 0,002$	$1,038 \pm 0,002$	$1,058 \pm 0,006$	$1,053 \pm 0,005$	$1,046 \pm 0,008$
1630/1656	$0,890 \pm 0,017$	$0,939 \pm 0,004$	$0,900 \pm 0,041$	$0,926 \pm 0,032$	$0,904 \pm 0,017$	$0,902 \pm 0,035$	$0,916 \pm 0,004$
1685/1656	$0,892 \pm 0,022$	$0,903 \pm 0,028$	$0,915 \pm 0,016$	$0,925 \pm 0,029$	$0,901 \pm 0,006$	$0,891 \pm 0,003$	$0,900 \pm 0,011$
1550/1535	$1,046 \pm 0,019$	$1,031 \pm 0,012$	$1,068 \pm 0,034$	$1,043 \pm 0,017$	$1,071 \pm 0,012$	$1,044 \pm 0,003$	$1,039 \pm 0,003$

Изменение соотношения интенсивностей полос поглощения в ИК-спектрах оксигемоглобина, модифицированного ДСН и облученного УФ-светом (151 Дж/м²)

Отношение частот (см ⁻¹)	Соотношение молекул белок – модификатор (Hb:ДСН)			
	без ДСН	1:100	1:50	1:25
1656/1650	1,017 ± 0,005	1,018 ± 0,005	1,018 ± 0,003	1,019 ± 0,006
1535/1516	1,076 ± 0,019	1,059 ± 0,006	1,048 ± 0,008	1,047 ± 0,007
1630/1656	0,890 ± 0,017	0,919 ± 0,006	0,934 ± 0,006	0,899 ± 0,021
1685/1656	0,892 ± 0,022	0,920 ± 0,009	0,934 ± 0,007	0,917 ± 0,009
1550/1535	1,046 ± 0,019	1,051 ± 0,019	1,054 ± 0,012	1,071 ± 0,025

обусловленный ДСН, но обладающий большей интенсивностью, чем аналогичный пик в спектре свободного детергента.

На основании полученных данных можно констатировать, что ДСН обуславливает в некоторой степени усиление α -спирализации, после чего наблюдается тенденция к структурной дезорганизации белка – происходят нарушения в укладке участков α -спирали, которые, возможно, могут располагаться подобно β -слоям. Наибольшая из использованных концентраций ДСН лежит в области критической концентрации мицеллообразования (ККМ), поэтому макромолекулы гемоглобина могут быть окружены мицеллами детергента. Как было показано в экспериментах с бычьим сывороточным альбумином [5], в таком случае молекулы белка имеют менее упорядоченную вторичную структуру и более высокую внутреннюю подвижность в мицеллярной системе по сравнению с белком в растворе.

Накапливаемые в системе скрытые повреждения можно выявить действием какого-либо внешнего физико-химического агента. Для этой цели нами было выбрано УФ-облучение, широко используемое в биологии и медицине. УФ-свет является естественным экологическим фактором, постоянно действующим на биосистемы. Возросший интерес к исследованию биологического действия УФ-излучения связан с проблемами нарушения целостности озонового слоя вследствие производственной деятельности человека. Актуальность проблемы диктует необходимость глубокого и целенаправленного изучения биологических эффектов действия УФ-света на молекулярном уровне для выяснения ключевых механизмов, лежащих в основе его деструктивного, мутагенного, а также лечебного и профилактического действия на живые организмы.

Нами были зарегистрированы ИК-спектры в указанных выше условиях модифицированного додецилсульфатом натрия оксигемоглобина (Hb:ДСН = 1:25, 1:50, 1:100), облученного в течение 1 мин (151 Дж/м²) УФ-светом. В результате исследований показано статистически достоверное уменьшение соотношения интенсивности полос поглощения при 1535 см⁻¹ (беспорядочная структура) к 1516 см⁻¹ (α -спираль): 1,076±0,019 (на-

тивный белок); 1,047±0,007 (1:25) и увеличение при 1630 см⁻¹ (β -складчатость) к 1656 см⁻¹ (α -спираль) уже при отношении белок – детергент 1:50: 0,890±0,017 (нативный белок); 0,934±0,006 (1:50); 0,919±0,006 (1:100), кроме того, выявлено возрастание этих величин при 1685 см⁻¹ (β -складчатость) к 1656 см⁻¹ (α -спираль): 0,892±0,022 (нативный белок); 0,934±0,007 (1:50). При остальных используемых для анализа частотах статистически достоверных отличий от немодифицированного гемобелка в соотношении интенсивностей полос поглощения не наблюдалось (табл.2).

Следовательно, УФ-свет индуцирует описанные выше нарушения структурной организации белка уже при меньших концентрациях ДСН в системе (Hb:ДСН = 1:50), что свидетельствует о наличии ряда скрытых изменений структурной организации гемопротейда.

Таким образом, на основании вышеизложенных данных, можно заключить, что ДСН домицеллярных концентраций вызывает определенные нарушения во вторичной структуре белка. Однако существенный вклад в выявленные в более ранних исследованиях изменения структурно-функциональных свойств оксигемоглобина при действии ДСН, вносят в первую очередь конформационные перестройки, затрагивающие высшие типы пространственной организации макромолекул – третичную и четвертичную структуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федотова Т.Ю., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. / Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий: Материалы XIV межреспубликанской научно-практической конференции. – Краснодар, 2001. – С. 224-227.
2. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. – М.: Мир, 1989. – 608 с.
3. Артюхов В.Г., Вашанов Г.А., Лавриненко И.А. / Вестник ВГУ. Серия 2. Естественные науки. – 1996. – № 2. – С. 3-10.
4. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. – М.: Сов. наука, 1957. – 139 с.
5. Захарченко Н.Л., Вылегжанина Н.Н., Файзуллин Д.А. / Структура и динамика молекулярных систем: Сб. статей. – Казань, 1999. – Вып. 6. – С. 194-196.