

УДК 577.322

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ФОТОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ АЗИДА НАТРИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ К МОЛЕКУЛАМ ГЕМОГЛОБИНА В РАСТВОРЕ

© 2004 г. О.Г. Солодовникова, Г.А. Вашанов

Воронежский государственный университет

Изучены изменения кислородсвязывающих свойств гемоглобина человека в растворе, индуцированные совместным воздействием широкого диапазона доз УФ-излучения и концентраций азид натрия. Показано, что высокие концентрации азид приводят к оксигенации гемоглобина, что, по-видимому, обусловлено активизацией фотопротекторных свойств модификатора.

В связи с возрастающим негативным воздействием коротковолнового УФ-света на живые объекты (фотодинамические эффекты, связанные с инактивацией белков и нуклеиновых кислот, инициацией мутагенных, антимиотических и других процессов) не вызывает сомнений актуальность поиска эффективных средств защиты организма от поражающего действия УФ-излучения и конкретных механизмов, обеспечивающих формирование адаптивных реакций к изменяющимся условиям окружающей среды. Вследствие этого активное развитие получил поиск химических модификаторов фоточувствительности – фотопротекторов, к числу которых относится азид натрия (NaN_3) [1].

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали растворы гемоглобина человека, полученные из крови взрослых доноров, в Na-фосфатном буфере (рН=7,4).

Водные растворы азид натрия готовили из кристаллического коммерческого препарата “Sigma” (США).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью выявления механизмов взаимодействия и функциональной активности гемоглобина от концентрации модифицирующего агента в экспериментах был использован широкий диапазон концентраций азид натрия от 10^{-6} до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и интервал доз УФ-света 151 – 1510 Дж/м².

Основным методом изучения функциональных свойств гемоглобина является спектрофотометрический метод регистрации кривых диссоциации оксигемоглобина (КДО), основанный на различиях в спектрах поглощения окси- и дезоксиформ [2].

Регистрация КДО осуществлялась на установке, состоящей из тонометра, вакуумметра ОБВ1 – 100,

спектрофотометра СФ-26, цифрового вольтметра Щ-1312, ультратермостата УТУ-4 и вакуумного насоса, соединенных системой вакуумных шлангов с кранами.

Опытные растворы гемоглобина в концентрации 10^{-5} моль/л получали по методу Дробкина с модификациями Блюменфельда [3].

УФ-облучение растворов гемобелка проводили с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 в термостатируемой кювете при 20° С. Для выделения необходимых составляющих УФ части спектра излучения лампы использовали светофильтр УФС-1 с полосой пропускания в области 240 – 400 нм.

Значения оптической плотности для растворов лигандных форм гемоглобина были получены на спектрофотометре СФ-26 (ЛОМО, России).

Для вычисления процентного содержания трех лигандных форм гемоглобина использовалась эмпирическая система уравнений Зварта [4].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью интегрированного пакета “Statgraphics” на ЭВМ типа IBM PC. Отличия в контрольных и опытных сериях экспериментов анализировали с помощью t-критерия Стьюдента при 5% уровне значимости [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки кислородсвязывающей способности растворов нативного и УФ-облученного гемоглобина человека нами были зарегистрированы кривые диссоциации. На основе полученных данных были рассчитаны такие показатели, как величина P_{50} (парциальное давление кислорода, при котором гемоглобин насыщен им на 50%), характеризующая степень сродства гемопротеида к лиганду, и константа Хилла (α), отражающая степень гем-гемового взаимодействия в молекуле гемоглобина. Полученные экспериментальные данные представлены в таблице 1.

Наблюдаемые при воздействии УФ – света в ука-

Зависимость величин P_{50} и константы Хилла (α) от дозы УФ-облучения

| Показатель | Доза облучения, Дж/м ² | | | | |
|------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 | 151 | 453 | 755 | 1510 |
| P_{50} | 19,1±1,70 | 14,1±0,60 | 14,3±0,70 | 13,9±0,50 | 14,1±0,80 |
| α | 2,7±0,12 | 1,4±0,10 | 1,6±0,12 | 1,4±0,50 | 1,2±0,13 |

Зависимость величин P_{50} и константы Хилла от концентрации азидата натрия и дозы УФ-облучения

| Концентрация азидата натрия, моль/л | Доза облучения, Дж/м ² | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | 0 | 151 | 453 | 755 | 1510 |
| 10^{-6} | 20,0±0,60 | 20,0±0,30 | 22,3±0,30 | 24,0±0,40 | 20,0±0,30 |
| | 2,70±0,14 | 2,37±0,23 | 2,40±0,20 | 2,14±0,36 | 2,20±0,27 |
| $5 \cdot 10^{-6}$ | 20,4±1,5 | 13,3±0,60 | 14,0±0,50 | 19,2±1,50 | 20,4±0,90 |
| | 2,54±0,15 | 2,11±0,20 | 2,21±0,12 | 2,30±0,60 | 2,12±0,51 |
| 10^{-5} | 11,0±0,60 | 19,8±0,60 | 19,8±0,60 | 22,0±0,20 | 24,2±0,20 |
| | 2,10±0,20 | 2,50±0,20 | 2,50±0,20 | 2,70±0,16 | 2,89±0,14 |
| 10^{-4} | 18,3±0,30 | 22,5±0,50 | 22,0±0,50 | 20,6±1,70 | 21,0±0,10 |
| | 2,00±0,17 | 2,70±0,14 | 2,20±0,01 | 2,90±0,40 | 2,26±0,12 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | 21,0±1,20 | 13,5±1,30 | 13,0±0,90 | 14,7±1,20 | 14,70±1,40 |
| | 2,57±0,40 | 2,20±0,50 | 2,60±0,41 | 2,09±0,57 | 2,12±0,12 |

Первая цифра соответствует значению P_{50} , вторая – значению константы Хилла.

занных дозах изменения структурных и функциональных свойств молекул гемоглобина обусловлены конформационными перестройками, затрагивающими третичную и четвертичную структуру. УФ – свет в первую очередь модифицирует конформационное состояние апобелка за счет преимущественного поглощения его хромофорами энергии квантов света. Изменение кислородсвязывающей активности обусловлено структурными перестройками, происходящими в белковой части гембелка, затрагивающими области субъединичных контактов и приводящими к диссоциации тетрамеров на низкомолекулярные компоненты.

Полученные сведения (табл. 2) о влиянии азидата натрия на структуру и функциональные свойства УФ-модифицированного гемоглобина свидетельствуют о том, что фотопротекторный эффект азидата достигается при сочетанном воздействии УФ-света и высоких концентраций ($\geq 10^{-5}$ моль/л) модификатора. Значения α свидетельствуют о том, что азидат оказывает повреждающее действие на гемопротейд, достигающее максимума при совместном действии максимальной концентрации модификатора и указанных доз облучения.

С увеличением концентрации NaN_3 отмечается общая структурная модификация белка. Это может быть обусловлено, с одной стороны, образованием функци-

ональных димеров Hb, а с другой – блокированием азидом центров связывания кислорода. И тот, и другой механизм может приводить к увеличению лигандсвязывающей способности гембелка. С другой стороны, может происходить изменение соотношения стабильных лигандных форм гемоглобина (метформы, дезоксиформы), что оказывает влияние на процесс связывания кислорода гетерогенной системой в целом.

Уменьшение величин константы Хилла во всем диапазоне облучения (концентрация азидата $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) указывает на затруднение гем-гемового взаимодействия и, следовательно, кооперативного связывания гемоглобином кислорода. Однако, несмотря на наблюдаемые изменения величин α и P_{50} , гемоглобин в растворах, подвергнутых сочетанному воздействию УФ-света и модификатора, продолжает проявлять свою функциональную активность. Значения $\alpha \geq 2$ позволяют сделать вывод о том, что молекулы гемопротейда не диссоциируют на димеры.

Суммируя полученные данные, можно высказать предположение о том, что известный фотозащитный эффект NaN_3 по отношению к гемоглобину имеет концентрационную и дозовую зависимость. Но характер этой зависимости различен для средства гемоглобина к кислороду, о чем судили по величинам P_{50} , и α .

Увеличение концентрации модификатора может затривать участки гемоглобина, пространственно удаленные как от мест связывания кислорода, так и от областей межсубъединичных контактов. Возможно, что наблюдаемые изменения величин P_{50} и α при увеличении концентрации азидна связаны с миграцией волны конформационных изменений макромолекулы, а в случае наибольшей концентрации азидна имеют место изменения денатурационного характера.

Исследование динамики соотношения лигандных форм гембелка в образцах (табл. 3) показывает, что использование азидна натрия в минимальной концентрации (10^{-6} моль/л) приводит к снижению содержания оксиформы гемоглобина в УФ-облученных образцах, сопровождающемуся повышением количества дезоксигемоглобина. Уровень метгемоглобина остается на постоянном уровне, большем, однако, чем для нативных растворов гембелка.

При концентрации азидна 10^{-4} моль/л и дозах облучения 151 – 755 Дж/м² наблюдается некоторое увеличение содержания оксиформы, сопровождающееся существенным снижением количества дезокси- и метформ.

В случае использования максимальной концентрации модифицирующего агента аналогичный характер изменений выявляется с дозы облучения 453 Дж/м².

Анализ динамики лигандных форм гемоглобина показывает, что азидна натрия в концентрациях 10^{-6} и $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л способствует стабилизации дезоксиформы гемоглобина и не приводит к окислению атома железа гема. Повышение концентрации NaN_3 до 10^{-4} моль/л при дозах облучения 151-755 Дж/м² способствует оксигенации гемоглобина и снижению количества дезокси- и метформы гембелка. Фотопротекторный эффект азидна обусловлен формированием комплекса с апобелковой частью макромолекулы и достигается при сочетанном воздействии высоких концентраций ($> 10^{-5}$ моль/л) модификатора и УФ-света в диапазоне доз 151-1510 Дж/м².

Изученная модельная система NaN_3/Hb позволяет судить о механизме изменений, происходящих в организме на молекулярном уровне под действием такого экологического фактора, как световое излучение (УФ-свет), и дает представление о существенных аспектах фотозащитного действия некоторых химических агентов, не встречающихся в природе.

Таблица 3

Изменение содержания лигандных форм гемоглобина в образцах, модифицированных азидом натрия и УФ-облучением

| Лигандная форма | Доза облучения, Дж/м ² | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0 | 151 | 453 | 755 | 1510 |
| 10^{-6} | | | | | |
| HbO ₂ | 77,4 ± 0,11 | 65,9 ± 0,07 | 65,45 ± 0,11 | 65,47 ± 0,12 | 63,00 ± 0,26 |
| Hb | 20,02 ± 0,30 | 31,50 ± 0,19 | 31,70 ± 0,14 | 31,60 ± 0,06 | 33,40 ± 0,60 |
| MtHb | 2,52 ± 0,67 | 2,52 ± 0,70 | 2,72 ± 0,17 | 2,90 ± 0,17 | 3,11 ± 0,53 |
| $5 \cdot 10^{-6}$ | | | | | |
| HbO ₂ | 65,30 ± 0,34 | 63,60 ± 0,12 | 62,50 ± 0,17 | 57,20 ± 0,11 | 53,60 ± 0,06 |
| Hb | 30,90 ± 0,11 | 32,80 ± 0,19 | 34,30 ± 0,34 | 41,40 ± 0,79 | 43,20 ± 0,11 |
| MtHb | 3,75 ± 0,17 | 3,53 ± 0,30 | 3,18 ± 0,34 | 1,30 ± 4,00 | 3,12 ± 0,27 |
| 10^{-5} | | | | | |
| HbO ₂ | 73,60 ± 0,06 | 72,52 ± 0,06 | 71,13 ± 0,17 | 72,05 ± 0,60 | 70,02 ± 0,03 |
| Hb | 23,20 ± 0,34 | 23,50 ± 0,12 | 25,10 ± 0,34 | 24,20 ± 0,11 | 26,20 ± 0,11 |
| MtHb | 3,18 ± 0,06 | 3,91 ± 0,30 | 3,72 ± 0,22 | 3,62 ± 0,22 | 3,70 ± 0,79 |
| 10^{-4} | | | | | |
| HbO ₂ | 66,80 ± 0,07 | 65,80 ± 0,06 | 67,30 ± 1,40 | 84,00 ± 0,56 | 69,60 ± 0,06 |
| Hb | 27,80 ± 1,90 | 27,90 ± 0,06 | 26,20 ± 0,02 | 12,10 ± 0,79 | 23,80 ± 0,06 |
| MtHb | 5,22 ± 0,06 | 6,10 ± 0,06 | 7,40 ± 0,06 | 3,54 ± 0,02 | 6,50 ± 0,27 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | | | | | |
| HbO ₂ | 69,50 ± 0,07 | 70,10 ± 0,07 | 71,48 ± 0,12 | 69,30 ± 0,30 | 62,11 ± 0,04 |
| Hb | 26,70 ± 0,11 | 26,50 ± 0,27 | 25,70 ± 0,14 | 27,80 ± 0,79 | 32,70 ± 0,11 |
| MtHb | 3,78 ± 0,01 | 2,40 ± 0,06 | 2,75 ± 0,34 | 2,78 ± 0,03 | 5,17 ± 0,07 |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сапежинский И.И. Сенсibilизированное фотоокисление белков и других веществ. Возможное значение этих процессов в фотобиологии // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. – М.: Наука, 1988. – С. 92–101.
2. Артюхов В.Г., Путищева О.В. Оптические методы анализа интактных и модифицированных биологических систем. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1996. – 242 с.
3. Блюменфельд М.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. – М.: Сов. наука, 1957. – 139 с.
4. Zwart A., Buursma A., van Kampen E.J. et al. A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1981. — Vol. 19, № 7. P. 457–463.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 351 с.
6. Шляпникох В.Я., Иванов В.Б. Тушение синглетного кислорода // Успехи химии. – 1976. – Т. XLV, вып. 2. – С. 202–203.