

УДК 577.3

ВПЛИВ МАГНІТНОГО ПОЛЯ НАДНИЗЬКОЇ ЧАСТОТИ НА АБСОРБЦІЙНІ СПЕКТРИ МЕТГЕМОГЛОБІНУ В УМОВАХ ЙОГО НЕСПЕЦИФІЧНОГО НАВАНТАЖЕННЯ БЕНЗОЛОМ

¹Цейслер Ю.В., ²Мартинюк В.С.

¹ Відкритий міжнародний університет розвитку людини «Україна»

² ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
 e-mail: yuliya.tseysler@gmail.com

Надійшла до редакції 11.02.2010

Досліджено вплив магнітного поля частотою 8 Гц 25 мкТл (МП НЧ) на абсорбційні спектри метгемоглобіну в області смуги Сорє в умовах неспецифічного насичення білка бензолом. Показано, що неспецифічне навантаження метгемоглобіну бензолом викликає відповідні зміни у просторовій структурі макромолекули, що відбивається у вигляді зсуву спектральної смуги Сорє у червону ділянку, а додатковий вплив МП НЧ в таких умовах призводить до виникнення нових конформаційних станів, які проявляються на крилах абсорбційної смуги Сорє. Зроблено висновок, що помітні конформаційні зміни можуть бути індуковані МП НЧ в основному за умов деформації просторової структури білкової молекули, зокрема завдяки її неспецифічному навантаженню неполярними сполуками.

Ключові слова: магнітне поле наднизької частоти, метгемоглобін, зміни конформації.

ВСТУП

На даний час є актуальним питання щодо визначення механізмів впливу змінних магнітних полів (ЗМП) на організм людини і тварин, як одного з глобальних екологічних факторів. Це з одного боку пов'язано зі швидким зростанням антропогенного електромагнітного фону і небезпекою «електромагнітного забруднення» середовища, а з іншого, - є цікавим вивчення біологічної дії ЗМП з характеристиками, які є близькими до природних електромагнітних варіацій [1-3]. Відомо, що магнітні поля наднизьких частот (МП НЧ) викликають різноманітні функціональні зміни в різних системах організму [4,5]. Результати досліджень первинних механізмів впливу МП НЧ на біологічні об'єкти сприяли формуванню цілого ряду незалежних гіпотез, які намагаються пояснити окремі ефекти впливу МП НЧ на молекулярному і клітинному рівнях [5-7]. Проте, слід відмітити, що молекулярні механізми впливу електромагнітних полів на біологічні системи залишаються неясними з причин відсутності єдиного об'єктивного і науково-теоретичного пояснення біологічних ефектів, що спостерігаються.

Згідно сучасних уявлень первинними акцепторами впливу даного фізичного фактору є клітинні і молекулярні структури (білки, хроматин, біологічні мембрани, мітохондрії та інші). Ці структури знаходяться в клітині у постійному контакті з водною

фазою. Саме роль води в біологічних ефектах ЗМП виявляється суттєвою і багатогранною [5,8], завдяки тому, що природні макромолекули і оточуюча їх вода формують єдину систему, яка не може бути розділена на компоненти без руйнування її суті. Загально відомо, що за умов сталих температури і тиску в системі «вода-біополімер» зміна термодинамічного хімічного потенціалу води неминуче спричиняє зміни хімічного потенціалу біополімеру. Це обумовлює залежність поведінки макромолекул від дії електромагнітного поля опосередковано через водну компоненту системи. Внаслідок цього стає можливою зміна гідрофобних взаємодій, які відіграють важливу роль в організації просторової структури білкових молекул, нуклеїнових кислот і біологічних мембран, формуванні молекулярних асоціатів, що впливає на динамічну поведінку і функціонування біополімерів. Таким чином, можна очікувати, що внаслідок МП-індукованих змін властивостей водної фази буде змінюватися поведінка неполярних речовин, що знаходяться в ній і розчиняються за гідрофобним механізмом. Одиначні експериментальні дані, зокрема з розчинності бензолу в воді і водних розчинах білків, переконливо свідчать про можливість такого впливу [8]. Це супроводжується певними змінами власної флуоресценції білків і оптичних абсорбційних спектрів [9,10]. Враховуючи ці факти, є інтересним з'ясування змін оптичних властивостей білків, що мають гідрофобні хромофори небілкової

природи, в умовах їх навантаження гідрофобними неспецифічними лігандами і впливу МП ННЧ. У зв'язку з цим метою цієї роботи було визначити і охарактеризувати зміни у спектрах поглинання метгемоглобіну, що викликані неспецифічним зв'язуванням бензолу в умовах дії МП частотою 8 Гц.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідженні використовували ліофільний препарат метгемоглобіну («Fluka», Німеччина).

Насичення води і розчинів білку бензолом здійснювали шляхом напластування 3 мл полярної фази (вода, білковий розчин) на 1.5 мл неполярної (бензол) с подальшою інкубацією системи при кімнатній температурі протягом встановленого часу без струшування.

Спектри поглинання білкових розчинів метгемоглобіну реєстрували діапазоні смуги Соре на спектрофотометрах СФ-16 і Spektromom 195. Точність установки довжини хвилі та її відтворюваність для вказаних приладів знаходились у межах 0.1-0.2 нм, фотометрична відтворюваність - $5 \cdot 10^{-3}$ одиниць оптичної густини. Диференціальні спектри отримували шляхом розрахунку за формулою $\Delta D_{(\lambda)} = D_{(\lambda)2} - D_{(\lambda)1}$, де $\Delta D_{(\lambda)}$ – різниця між оптичними густинами насиченого і ненасиченого бензолом розчинів метгемоглобіну, $D_{(\lambda)2}$ – оптична густина насиченого бензолом розчину білка, $D_{(\lambda)1}$ – оптична густина ненасиченого розчину.

Розчини метгемоглобіну піддавали впливу МП наднизької частоти, яке створювали за допомогою кілець Гельмгольца. Імпульси були прямокутної форми та різної полярності. Частота магнітного поля складала 8 Гц, індукція - 25 мкТл. Частота магнітного поля вибрана на основі її екологічної та геофізичної значущості [1,2]. Вектор індукції створюваного магнітного поля був паралельним вектору геомагнітного поля. Досліджувані зразки поміщували в кільця Гельмгольца. Контрольні проби знаходились в умовах фонових значень електромагнітного поля наднизьких частот, характерних для даної лабораторії (20-65 нТл). Для оцінки можливого впливу різниць у рівні фонових магнітних полів в місцях розташування дослідних та контрольних зразків проводили експерименти з уявною дією магнітного поля. В цьому випадку досліджувані зразки поміщали в кільця Гельмгольца, не піддаючи дії магнітного поля.

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, використовуючи t-критерій Стьюдента для оцінки достовірності різниць між статистичними вибірками.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При взаємодії метгемоглобіну з бензолом спостерігається гіпохромний ефект, який складає

19.4% ($p < 0,05$) після 1 і 2 годин інкубації (рис. А, Б), 8.3% після 4 годин (рис. В) і 22% після 24 годин ($p < 0,05$) (рис. Г). Такі зміни свідчать про збільшення впорядкованості системи на рівні міжмолекулярних взаємодій, скоріше за все, завдяки утворенню асоціатів молекул метгемоглобіну. Водночас з цим чітко спостерігається невеликий «червоний» зсув в середньому на 1-3 нм в залежності від експозиції (рис., табл. 1). Такий зсув є очікуваним і є наслідком неспецифічного зв'язування неполярних молекул бензолу гідрофобними порожнинами метгемоглобіну, в тому числі і гідрофобними і прилеглими до них ділянками, в яких розташовано гем. З часом насичення білка бензолом зростає, що призводить до поступового зростання значень λ_{\max} . Таке явище є характерним для насичення гем-вміщуючих білків неполярними сполуками [11].

Аналіз впливу МП ННЧ на абсорбційні спектри метгемоглобіну показав відсутність достовірних змін максимуму смуги Соре і оптичної густини на максимумі поглинання, але, як виявилось, найбільші зміни відбувались на крилах спектру поглинання гему. Про це свідчать результати оцінки основних параметрів диференціальних спектрів, що наведені в таблиці 2. Слід відмітити, що згідно отриманим даним, саме крила спектру є найбільш чутливими до різних впливів, в тому числі неконтрольованих факторів, зокрема таких, як електромагнітний фон в лабораторії. Отримані дані свідчать, що різниця в фоновому електромагнітному оточенні в лабораторії для контрольних зразків і тих, що піддавали фіктивному впливу, була окремим фактором, що призводила до протилежних змін, порівняно з тими, що спричиняла дія МП ННЧ частотою 8 Гц 25 мкТл (табл. 2). На нашу думку цей факт значно підвищує достовірність впливу МП ННЧ на спектри поглинання метгемоглобіну, які демонструють особливості структурної організації молекули цього білку. Зокрема, в диференціальних спектрах з часом експозиції МП ННЧ маємо сталу тенденцію до збільшення значення λ_{\max} , тоді як в умовах фіктивної дії спостерігали зменшення цього показника. Подібна тенденція була характерною і для показника $\lambda_{\max} - \lambda_{\min}$, а для λ_{\min} такий ефект спостерігався тільки для одноденної експозиції. Параметр $D_{\max} - D_{\min}$ у диференціальному спектрі також зазнавав змін під впливом МП ННЧ. В умовах дії МП значення цього показника достовірно зменшувались протягом 2-х і 4-х годин експозиції. Встановлені зміни свідчать про те, що вплив МП 8 Гц 25 мкТл призводить до деформації спектру на крилах смуги Соре шляхом зсуву відповідних бокових ділянок спектру в червону область. Але є цікавим той факт, що цей зсув не торкається центрального положення смуги λ_{\max} .

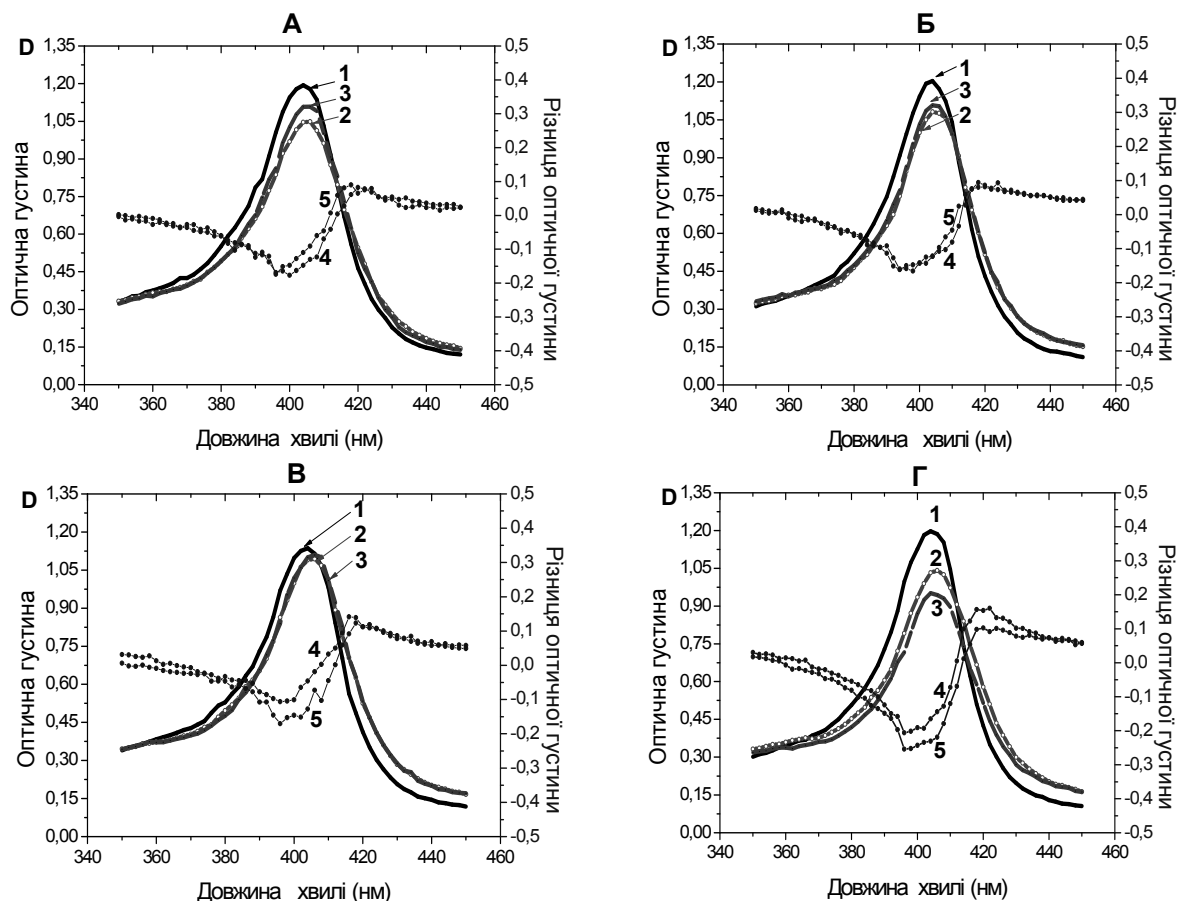


Рис. Абсорбційні (1, 2, 3) і диференційні (4, 5) спектри 0.02% контрольних розчинів метгемоглобіну, і тих, що взаємодіють з бензолом під впливом МП частотою 8 Гц індукцією 25 мкТл протягом 1 (А), 2 (Б), 4 (В) і 24 (Г) годин. Наведені спектри отримано шляхом усереднення окремих спектральних ліній, що зареєстровані у 15 повторних експериментах.

- 1 – контрольний спектр інтактного білка;
- 2 – білок, що взаємодіє з бензолом;
- 3 – білок, що взаємодіє з бензолом під впливом МП;
- 4 – диференційний спектр білку, що взаємодіє з бензолом;
- 5 – диференційний спектр білку, що взаємодіє з бензолом під впливом МП.

Таблиця 1.

Основні параметри спектрів поглинання метгемоглобіну, що взаємодіє з бензолом при уявній дії ЗМП в області смуги Сорє 350-450 нм

Час експозиції (години)	Параметр	Контрольні зразки	Фіктивна дія поля	Взаємодія з бензолом	Взаємодія з бензолом при фіктивній дії поля
1	$\lambda_{\max}, \text{нм}$	404,4±0,3	404,2±0,2	405,6±0,6	405,4±0,4
2		404,2±0,2	404,0±0,0	405,2±0,3*	405,6±0,4*
4		404,4±0,4	404,0±0,0	405,8±0,4*	405,4±0,3
24		404,4±0,3	404,0±0,0	407,0±0,6*	406,5±0,3*
1	$D_{\max}, \text{о.о.з}$	1,207±0,020	1,197±0,020	1,077±0,058	1,090±0,051
2		1,208±0,022	1,150±0,051	1,116±0,033	1,118±0,038
4		1,239±0,017	1,218±0,085	1,105±0,025	1,107±0,036
24		1,280±0,062	1,258±0,086	1,110±0,112	1,054±0,054

Примітки: *- достовірні різниці відносно контрольних зразків (p<0,05).

Таблиця 2.

Основні характеристики диференційних спектрів поглинання метгемоглобіну, що взаємодіє з бензолом під впливом МП на ділянці смуги Сорє 350-450 нм

Час експозиції (години)	Параметр	Контрольні зразки	Вплив магнітного поля	Фіктивна дія	Зміна відносно контрольних зразків (%)	Зміна відносно фіктивної дії (%)
1	λ_{\max} , нм	422,3±1,8	420,2±1,6	419,4±1,4	-0,4	-0,1
2		421,5±1,5	423,0±1,7	421,9±1,4	+0,3	-0,3
4		419,9±1,3	422,0±1,2	419,1±1,3	+0,5	-0,7
24		422,1±0,9	424,0±1,0**	417,9±1,0*	-1,0	-1,4
1	λ_{\min} , нм	398,1±0,8	400,2±1,3**	394,0±1,6*	+0,5	+1,5
2		399,4±1,0	397,3±0,7	394,5±1,7*	-0,5	+0,7
4		399,3±1,6	399,8±0,6	397,4±1,0	+0,1	+0,6
24		397,9±1,2	398,5±2,0	398,9±1,1	+0,3	+0,1
1	$\lambda_{\max}-\lambda_{\min}$, нм	24,2±1,8	20,0±1,8**	25,4±1,7	-17,0	-21,0
2		22,1±1,5	25,7±1,7	27,4±2,3*	+16,3	-6,0
4		20,6±1,7	22,2±1,9*	21,7±1,7	+7,7	+2,3
24		23,2±1,6	31,5±1,9**	22,1±0,9	-4,7	-29,8
1	$D_{\max}-D_{\min}$, о.о.з.	0,344±0,032	0,344±0,042	0,338±0,051	0,0	-1,8
2		0,283±0,023	0,275±0,028**	0,365±0,029*	-2,8	-24,7
4		0,341±0,020	0,278±0,037**	0,382±0,025	-18,5	-27,2
24		0,461±0,026	0,474±0,038	0,430±0,036	-6,7	-9,2

Примітки: * - достовірні різниці відносно контрольних зразків ($p < 0,05$); ** - достовірні різниці відносно фіктивного впливу ($p < 0,05$).

Виникає закономірне питання про причину виявлених змін. Згідно з даними Ізмайлової В.Н. [11] насичення білків вуглеводнями відбувається повільно і виходить на плато приблизно через 12-24 години. Як видно з таблиці 1 в нашому випадку це відбувається на значенні максимуму смуги Сорє, яке зростає протягом часу інкубації. Такі зміни, як свідчать дані літератури [12], є характерними для гем-вміщуючих білків. Згідно з попередніми даними [8] насичення гідрофобних порожнин білку бензолом посилюється в умовах дії ЗМП. Але це посилення, як показують результати цього дослідження, у метгемоглобіні не позначається на значенні максимуму смуги Сорє, але в цілому призводить до невеликого червоного зсуву спектру. Якщо вважати, що спектральні зміни, які зареєстровані, певним чином відбивають конформаційні зміни в молекулі метгемоглобіну, то можна зробити висновки про те, що насичення цього білку бензолом викликає відповідні зміни у його просторовій структурі, а додатковий вплив МП ННЧ в таких умовах призводить до виникнення нових конформаційних станів, які проявляються на крилах абсорбційної смуги Сорє. Цей факт певним чином підтверджує раніше знайдені ефекти селективної дії МП ННЧ на конформаційні стани сироваткового альбуміну [13]. Водночас з цим знаходить підтвердження ідея про те, що у звичайних умовах за відсутності конформаційних напружень в молекулах білків ефекти впливу МП практично не спостерігаються, але можуть бути індуковані цим фізичним фактором в умовах деформації просторової структури, зокрема завдяки неспецифічному навантаженню неполярними сполуками. Саме цей механізм може бути пусковим моментом МП-

залежної активації системи білків теплового шоку в клітинах, що спостерігали різні дослідницькі групи [14,15], і в певній мірі може пояснити залежність відповіді клітини на вплив МП від її структурного і функціонального стану [16].

ВИСНОВКИ

1. Насичення метгемоглобіну бензолом викликає відповідні зміни у його просторовій структурі, що відбувається у вигляді зсуву спектральної смуги Сорє у червону ділянку, а додатковий вплив МП ННЧ в таких умовах призводить до виникнення нових конформаційних станів, які проявляються на крилах абсорбційної смуги Сорє.

2. Помітні конформаційні зміни можуть бути індуковані МП ННЧ в основному в умовах деформації просторової структури білкової молекули, зокрема завдяки її неспецифічному навантаженню неполярними сполуками.

Література

1. Мартынюк В.С., Темурьянц Н.А., Владимирский Б.М. У природы нет плохой погоды: космическая погода в нашей жизни. - Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2008. - 179 с.
2. Пресман А. С. Электромагнитные поля и живая природа. - М.: Наука, 1968. - 288 с.
3. Владимирский Б.М., Темурьянц Н.А. Влияние солнечной активности на биосферу-атмосферу. - М.:Изд-во МНЭПУ, 2000. - 374 с.
4. Холодов Ю.А. Мозг в электромагнитных полях. - М.: Наука, 1982. -123 с.
5. Бинги В.Н. Магнитобиология: эксперименты и модели. - М.: МИЛТА, 2002. - 592 с.

6. Леднев В.В. Биологические эффекты краине слабых переменных магнитных полей: идентификация первичных мишеней / Сб. научных работ Объединенного института физики Земли им. О.Ю. Шмидта. - М., 2003- С. 130- 136.
7. Liboff A.R. Geomagnetic cyclotron resonance in living cells // J. Biol. Phys.. - 1985. - Vol. 13. - P. 99 – 102.
8. Мартынюк В.С., Шадрина О.Г. Влияние переменного магнитного поля крайне низкой частоты на растворимость бензола в воде и растворах белка // Биомедицинская радиоэлектроника. – 1999. - № 2. – С. 61-63..
9. Martynyuk V.S., Tseysler Yu. V. The Hydrophobic-Hydrophilic Balance in Water Solution of Proteins as The Possible Target for Extremely Low Frequency Magnetic Fields // In: Biophotonics and Coherent Systems in Biology - Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2006. – P. 105 – 122.
10. Цейслер Ю.В., Мартынюк В.С., Артеменко А.Ю., Мирошниченко Н.С. Влияние магнитного поля разных частот на собственную флуоресценцию сывороточного альбумина // Физика живого. – 2009. – Т. 17, № 1. – С. 95 – 97.
11. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. – М.: Наука, 1974. – 286 с.
12. Ахрем А.А., Тищенко Е.И., Киселев П.А., Метелица Д.И. Спектральные характеристики взаимодействия цитохрома с и гемоглобина с метанолом и анилином // Биохимия. -1978. - Т. 43., № 11. - С. 2033-2037.
13. 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. 86-90.
14. Tokalov S.V., Gutzeit H.O. Weak electromagnetic fields (50 Hz) elicit a stress response in human cells // Environ. Res. - 2004. - Vol. 94, N 2. - P. 145 - 151.
15. Coulton L.A., Harris P.A., Barker A.T., Pockley A.G. Effect of 50 Hz electromagnetic fields on the induction of heat-shock protein gene expression in human leukocytes // Radiat. Res. - 2004. - Vol. 161, N 4. - P. 430 – 434.
16. Новиков В.В. Биологические эффекты слабых и сверхслабых магнитных полей. - Автореф. дис. ... док. биол. наук, 03.00.02 - «биофизика». - М., 2005. - 43 с.

ВЛИЯНИЕ МАГНІТНОГО ПОЛЯ КРАЙНЕ НИЗЬКОЇ ЧАСТОТИ НА АБСОРБЦІЙНІ СПЕКТРИ МЕТГЕМОГЛОБІНА В УМОВАХ ЙОГО НЕСПЕЦИФІЧНОЇ НАГРУЗКИ БЕНЗОЛОМ

Цейслер Ю.В. , Мартынюк В.С.

Исследовано влияние магнитного поля (МП) частотой 8 Гц 25 мкТл на абсорбционные спектры метгемоглобина в области полосы Соре в условиях неспецифического насыщения данного белка бензолом. Показано, что нагрузка метгемоглобина бензолом вызывает соответствующие изменения в пространственной структуре макромолекулы, что отражается в виде сдвига спектральной полосы Соре в красную область, а дополнительное влияние МП в таких условиях приводит к возникновению новых конформационных состояний, которые проявляются на крыльях абсорбционной полосы Соре. Сделан вывод о том, что заметные конформационные изменения могут быть индуцированы действием МП в основном при деформации пространственной структуры белковой молекулы, в частности вызванной ее неспецифической нагрузкой неполярными соединениями.

Ключевые слова: магнитное поле сверхнизкой частоты, метгемоглобин, конформационные изменения.

INFLUENCE OF EXTREMELY LOW FREQUENCY MAGNETIC FIELD ON ABSORPTION SPECTRES OF METGEMOGLOBIN SATURATED NONSPECIFICALLY BY BENZENE

Tseyslyer Yu.V. , Martynyuk V.S.

The influence of magnetic field with frequency 8 Hz 25 μ T on absorption spectra in the Soret's band of metgemoglobine upon nonspecific saturation of protein by benzene was studied. It was shown that load of metgemoglobine by benzene causes corresponding changes in spatial structure of macromolecules, reflected in a shift of Soret's spectral bands in the red area and the additional effect of ELFMF in this conditions leads to the emergence of new conformation states which are appear on the wings of Soret's absorption bands. The conclusion was made that noticeable conformational change can be induced by ELFMF mainly in terms of deformation of the spatial structure of protein molecules, especially under its nonspecific loading by non-polar compounds.

Key words: extremely low frequency electromagnetic field, metgemoglobin, conformation changes.