

Е.О. Ромоданова, Т.С. Дюбко, Т.Ф. Морозова,
О.Д. Рошаль, В.Б. Дістанов, Ю.О. Гуркаленко

Вплив низькоенергетичного лазерного випромінювання на структуру та властивості молекули білка за умов неспецифічного поглинання енергії

Исследовали эффект действия гелиево-неонового лазера на сывороточный альбумин человека с использованием чувствительного к конформационным изменениям белка флуоресцентного зонда 4-морфолино-7-окси-7-Н-бензо-[de]-бензо-[4,5]-имидазо-[2,1-a]-изохинолин-5-сульфоновой кислоты (МНБИС). Анализировали показатели спектров флуоресценции и кинетики встраивания зонда в молекулу белка. Обсуждаются возможные механизмы действия гелиево-неонового лазера на структуру водно-белкового раствора.

ВСТУП

Медицина потребує нових наукових розробок, удосконалення існуючих і створення нових напрямків у діагностиці. Нині флуориметрія органів, тканин, клітин та їх окремих компонентів оцінюється як перспективний метод діагностики [15]. До переваг методу флуоресцентного аналізу відносяться висока чутливість, відносна простота та швидкість отримання результатів. Існують дві модифікації флуориметрії: з використанням власної флуоресценції компонентів клітин або за допомогою флуоресцентних зондів. У цій роботі ми застосували методи флуоресцентних зондів і синхронного сканування для розділення флуоресценції власних хромофорів білка при дослідженні конформаційних змін молекули сироваткового альбуміну людини (САЛ) під впливом низькоенергетичного лазерного випромінювання (НЕЛВ).

Широке використання НЕЛВ у медицині, методах терапії та діагностики зумовлює актуальність вивчення механізмів поглинання енергії лазерного випроміню-

вання біологічними тканинами. На роль акцепторів енергії запропоновано різноманітні біологічні структури, обговорюються можливості існування декількох механізмів взаємодії НЕЛВ з акцепторами. З метою з'ясування внеску кожного з можливих механізмів необхідні експериментальні дослідження, в яких хоча б один із можливих механізмів був виключений. У нашій роботі досліджено ефект впливу НЕЛВ гелій-неонового лазера на САЛ, який не має хромофорної групи в оптичному діапазоні випромінювання лазера.

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були розчини САЛ ("Reanal", Угорщина), приготовлені на попередньо опроміненій і неопроміненій дистильованій воді (рН 5,5). У першому випадку маточний розчин білка змішували з опроміненою водою у співвідношенні 1:1. Опромінення здійснювали гелієво-неоновим лазером з довжиною хвилі 632,8 нм, потужністю випромінювання 5 мВт протягом 5 хв. Як флуоресцентний

зонд було використано 4-морфоліно-7-окси-7-Н-бензо-[de]-бензо-[4,5]-імідазо-[2,1-a]-ізохінолін 5-сульфонову кислоту (МНБІС), структурна формула якої зображена на рис. 1.

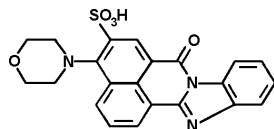


Рис. 1. Структурна формула МНБІС.

Синтез МНБІС було здійснено в НТУ “ХПІ” [16]. Показано, що МНБІС добре зв’язується з альбуміном і показники його флуоресценції чутливі до конформаційних змін білка [12 – 14,16,17].

Спектр флуоресценції МНБІС у білковому розчині має складну форму з максимумом основної смуги близько 528 нм ($\lambda_{\text{макс фл}}$) і квантовим виходом (Φ), що становить 0,054 (рис. 2). Для аналізу спектрів і розділення його компонентів використовували програмний пакет Spectra Data Lab, розроблений у НДІ хімії ХНУ (автор А.О.Дорошенко).

Емісію зонда та білка реєстрували на спектрофлуориметрі “Hitachi F-4010” (Японія) з автоматичною корекцією спектрів. Було використано довжину хвилі збудження 435 нм. Ширина вхідної і вихідної щілин монохроматора була 5 нм. Крок сканування монохроматора – 0,2 нм, час на-

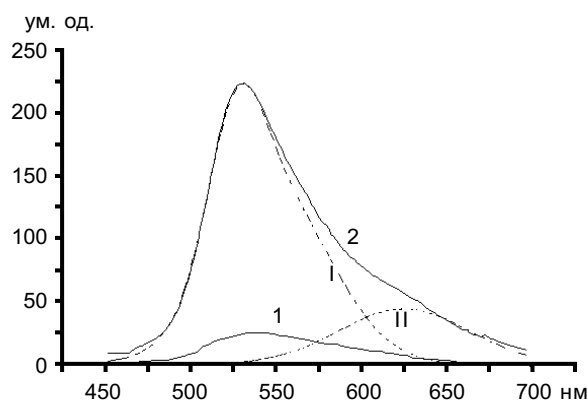


Рис. 2. Спектри флуоресценції зонда МНБІС у воді (1), у розчині сироваткового альбуміну людини та компоненти спектра зонда в білку (I, II).

копичення спектрів – 2 с.

Для розділення тиразинової та триптофанової компонент було отримано синхронні спектри флуоресценції зі скануванням довжини хвилі збудження від 260 до 310 нм і довжини хвилі випромінювання – від 280 до 330 нм [1]. Оптимальний синхронний спектр спостерігався при зсуві монохроматорів 20 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У літературі описано [3,5,8,10,11] можливість зміни властивостей води та розчинених у ній сполук у разі попередньої її неспецифічної взаємодії з електромагнітним випромінюванням. З метою дослідження змін властивостей води, яка зазнала дії лазерного променя, ми визначали кінетику вбудовування МНБІС при додаванні його до опроміненого розчину САЛ і до такого самого розчину, приготовленого на опроміненій воді. Концентрація білка становила $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, а концентрація зонда – $1,14 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Показники спектрів флуоресценції змінюються в перші 30 хв після введення зонда в білковий розчин. На рис. 3 показано залежність інтенсивності спектрів флуо-

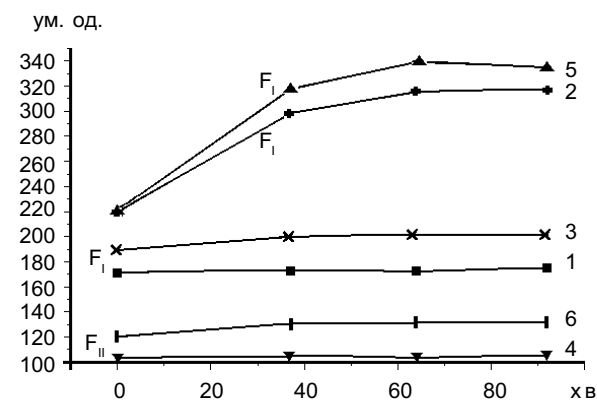


Рис. 3. Залежність від часу інтенсивностей короткохвильової (F_I) та довгохвильової (F_{II}) компонент спектра МНБІС у розчині сироваткового альбуміну людини: 1, 4 – нативний білок; 2, 5 – після низькоенергетичного лазерного випромінювання; 3, 6 – білок, розчинений на опроміненій воді.

Вплив низькоенергетичного лазерного випромінювання на параметри спектрів флуоресценції (відп. од.) МНБІС у розчинах сироваткового альбуміну людини (САЛ)

Схема досліджу	Інтенсивність флуоресценції компонент спектра	
	I_1	I_2
МНБІС у нативному розчині САЛ	62,8±1,2	176,1±3,6
МНБІС, добавлений до САЛ, розчиненому в опроміненій воді	85,9±1,5	200,1±4,0
МНБІС, добавлений до розчину опроміненого САЛ	226,2±2,5	326,9±2,8

$P < 0,05$.

ресценції МНБІС від часу при доданні зонда до білкового розчину. Підвищення інтенсивності свідчить про наявність кінетики взаємодії зонда з білком. У таблиці наведено результати аналізу спектрів після закінчення процесу.

Чутливість флуоресцентного зонда як маркера структурного стану білка оцінювали за умов його надлишку [2], коли заповнюється перший високоафінний центр сорбції.

Як видно з таблиці, опромінення розчину білка НЕЛВ викликає значну зміну форми спектральної кривої зонда та підвищення інтенсивності смуг випромінювання. Особливо це проявляється в разі довгохвильової компоненти спектра. Опромінення розчинника (води) призводить до несуттєвих змін порівняно зі спектрами контрольного неопроміненого зразка.

Для контрольного й опроміненого розчинів було визначено константу зв'язування зонда K_c і кількість місць зв'язування N [14]. Для дослідження показників зв'язування було використано значення інтенсивності обох смуг у спектрах флуоресценції. В обох випадках розрахунки призвели до узгоджених результатів, що дають значення константи зв'язування зонда з білком K_c становить $(1,9 \pm 1,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, а число центрів зв'язування N – 4-5. Опромінення лазером суттєво не впливає на кількість високоафінних центрів зв'язування зонда чи на константу зв'язування МНБІС з цими центрами.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що зміни інтенсивності смуг і форми спектральної кривої зонда в результаті дії НЕЛВ на розчин білка визначаються зміною характеру мікрооточення зонда. Можливо, зміни в мікрооточенні створюють додаткові умови для взаємодії сульфогрупи зонда з близько розташованими амінокислотними залишками білка.

Частково такі умови створюються не тільки під час опромінення білка, але й при розчиненні САЛ у попередньо опроміненій воді, що досить добре узгоджується з літературними даними [6]. Одержані результати свідчать, що під дією НЕЛВ відбувається зміна структури водно-білкового розчину.

Аналіз синхронних спектрів флуоресценції білка без додавання зонда показав, що зміни властивостей мікрооточення впливають і на випромінювання власних флуорофорів білка. Це більш чітко проявляється у зміні стану індольного кільця триптофану. Вищезгадані зміни мікрооточення залишків ароматичних амінокислот САЛ можуть бути викликані конформаційною перебудовою САЛ внаслідок взаємодії сольватної оболонки білка з кластерами у так званій “вільній” воді розчину [7,9,10].

E.A.Romodanova¹, T.S.Dyubko³, T.F.Morozova³, A.D.Roshal², V.B.Distanov⁴, Yu.A.Gurkalenko⁴

LOW-INTENSIVE LASER IRRADIATION INFLUENCE ON PROTEIN MOLECULE STRUCTURE AND PROPERTIES UNDER NON-SPECIFIC ENERGY ABSORBANCE

The influence of the helium-neon laser emission on HSA was investigated at present work by means of the fluorescent

probe MNBIS (4-morpholino-7-oxy-7-H-benzo-[de]-benzo-[4,5]-imidazo-[2,1-a]-isoquinolin-5-sulfonic acid) sensitive to protein conformational changes using. Fluorescence spectra parameters of the probe and kinetics of probe interaction with protein molecules were analyzed. Possible mechanisms of the helium-neon laser irradiation on water-protein solution structure are discussed.

¹Laser Biology and Laser Medicine Research Institute at V.N.Karazin Kharkov National University; ²Chemistry Research Institute at V.N.Karazin Kharkov National University; ³Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian National Academy of Sciences; ⁴National Technical University "KPI"

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Векшин Н.Л. Разделение тирозиновой и триптофановой компонент флуоресценции методом синхронного сканирования // Биофизика. – 1996. – **41**, вып. 6. – С. 1176–1179.
2. Гаврилов В.Б. Характеристика чувствительности флуоресцентных маркеров структурного состояния и связывающей способности белков // Там же. – 2000. – **45**, вып. 6. – С. 421–426.
3. Генкин М.В., Блюменфельд Л.А. Реакция восстановления феррицитохрома С аскорбатом в водном растворе после предварительного нагревания воды // Там же. – 1997. – **42**, вып. 1. – С. 22–26.
4. Добрецов Г.Е. Исследование структуры белков методом флуоресцентных зондов. – В кн.: Итоги науки и техники. – М., 1975. – Т. 6. – С. 34–93.
5. Казаченко В.Н., Дерюгина С.Н., Кочетков К.В., Фесенко Е.Е. Влияние примесей на снижение в воде [O₂] под действием миллиметрового излучения // Биофизика. – 1999. – **44**, вып. 5. – С. 796–805.
6. Карнаухов А.В., Пономарев В.О. Дисипативный резонанс – новый класс физических явлений. Некоторые подходы к аналитическому описанию // Биомед. технологии и радиоэлектроника. – 2001. – № 8. – С. 23–31.
7. Кувичкин В.В., Новиков В.В., Алюшев Ф.К. и др. Действие бидистиллированной модифицированной воды на конформационное состояние бычьего сывороточного альбумина. Оценка методами флуоресцентной спектроскопии // Биофизика. – 2001. – **46**, вып. 1. – С. 43–45.
8. Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шухлинская Р.Э., Мазурова Т.Н. Собственная люминесценция воды и сильно разбавленных растворов дипептидов // Там же. – 1994. – **39**, вып. 4. – С. 565–570.
9. Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Щербин Д.Г. Внутримолекулярная динамика и функциональная активность белков // Там же. – 2000. – **45**, вып. 6. – С. 965–989.
10. Новиков В.В., Кувичник В.В., Фесенко Е.Е. Влияние слабых комбинированных постоянного и переменного низкочастотных магнитных полей на собственную флуоресценцию ряда белков в водных растворах // Там же. – 1999. – **44**, вып. 2. – С. 224–230.
11. Пономарева О.Н., Фесенко Е.Е. Свойства жидкой воды в электрических и магнитных полях // Там же. – 2000. – **45**, вып. 3. – С. 389–398.
12. Ромоданова Э.А., Дистанов В.Б., Гуркаленко Ю.А. и др. Применение флуоресцентных зондов для изучения конформационных изменений белка при облучении низкоинтенсивным He-Ne лазером. – В кн.: Материалы XIII Междунар. науч.-практ. конф. “Применение лазеров в медицине и биологии” (5–8 окт. 1999). – Алупка, 1999. – С. 12–13.
13. Ромоданова Э.А., Дистанов В.Б., Гаврик В.А. и др. Влияние низкоэнергетического лазерного излучения на взаимодействие САЧ с флуоресцентным зондом. – В кн.: Тез. докл. IV съезда Белорус. об-ва объединения фотобиологов и биофизиков. (28–30 июня 2000 г.). – Минск, 2000. – С.186.
14. Ромоданова Э.А., Гаврик В.А., Рошаль А.Д. и др. Изменение конформации САЧ под влиянием замораживания и лазерного излучения по данным флуоресценции производного нафталевой кислоты // Пробл. криобиологии. – 2000. – № 3. – С. 28–32.
15. Самойлов В.О., Барский И.Я., Бигдай Е.В. и др. Прижизненная флюориметрия в физиологии и клинике // Мед. техника. – 1997. – Вып. 3. – С. 3–7.
16. Distanov V.B., Dyubko T.S., Gurkalenko Yu.A. et al. 3-sulpho-4-morpholinonaphthalic acid derivatives as a potential fluorescent probes for protein. – In: Third Conference of Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes. – Prague, 1999. – P. 29.
17. Zhydenko V.I., Gatash S., Dyubko T., Romodanova E. The conformation changes of human serum albumin under influence of freezing and laser irradiation. – In: 7th Confer. on Methods and Applications of Fluorescence. (16–19 sept. 2001). – Amsterdam, 2001. – P. 214.

Наук.-досл. ін-т лазер. біології і лазер. медицини Харків.ун-ту ім. В.М.Каразіна;
Наук.-досл. ін-т хімії Харків. ун-ту ім. В.М.Каразіна;
Ін-т проблем криобіології і кріомедицини НАН України;
Нац. техн. ун-т “ХПІ”; Харків