

В. Д. ЛУКЬЯНЧУК

СВЯЗЫВАНИЕ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА СЫВОРОТКОЙ КРОВИ И ЕЕ БЕЛКОВЫМИ ФРАКЦИЯМИ

Изучено взаимодействие 2,4-динитрофенола с сывороткой крови и ее белковыми фракциями. Доказано, что основным компонентом сыворотки, взаимодействующим с этим веществом, является альбумин. При этом установлены количественные параметры комплексообразования, а также выявлен конформационный переход альбумина с образованием гидрофобной зоны локализации вещества на протеине.

Связывание химических соединений сывороткой крови и ее белковыми компонентами является важной стороной кинетики в организме и одним из звеньев механизма их действия [3, 5, 8, 9, 11, 12]. Изучение количественных параметров взаимодействия токсических веществ с белками сыворотки крови служит необходимым этапом токсикокинетики, т. к. при этом могут быть получены важные сведения о распределении ядов в организме, их накоплении в биосубстратах и скорости элиминации, а это, в свою очередь, позволяет выяснить некоторые факторы, влияющие на токсичность ксенобиотиков. Согласно современным представлениям, токсичность химических соединений пропорциональна их сродству к сывороточному альбумину [10].

Вопросы взаимодействия 2,4-динитрофенола с белками сыворотки крови до настоящего времени не изучены. В связи с этим было целесообразным изучить на молекулярном уровне процессы связывания 2,4-динитрофенола сывороткой крови и ее белковыми фракциями, что и являлось целью настоящей работы.

Предпосылкой для проведения данных исследований является довольно широкое использование 2,4-динитрофенола в народном хозяйстве. Вместе с тем данное соединение способно вызывать острые и хронические интоксикации при пероральном, ингаляционном и перкутанном поступлении в организм человека. Известны случаи смертельных отравлений 2,4-динитрофенолом в производственных условиях [4].

В процессе работы по изучению связывания 2,4-динитрофенола с белками сыворотки крови получены сведения, расширяющие имеющиеся представления о молекулярных механизмах взаимодействия ксенобиотиков с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), что имеет определенное теоретическое значение.

Методика исследования

Исследования процессов связывания 2,4-динитрофенола цельной сывороткой крови практически здоровых доноров, а также различными белковыми фракциями сыворотки, такими как альбумин, γ -глобулин, β -липопротеид и α -гликопротеид, проводили методом равновесного диализа в модифицированном нами аппарате Чёгёра [12]. Количественное определение 2,4-динитрофенола осуществляли колориметрически [2]. Использовали химически чистый 2,4-динитрофенол, кристаллический пре-

парат сывороточного альбумина человека («Reanal», Венгрия). Другие же белковые фракции выделяли по методу Cohn [13] с последующим уравниванием на сефадексе L-25 и электрофоретическим контролем чистоты полученных образцов.

Количественные параметры связывания 2,4-динитрофенола с ЧСА оценивали по величинам константы ассоциации комплекса ($K_{асс}$) и числа мест связывания (N). Для этого проводилась при помощи ЭВМ «Наири 3-1» линеаризация данных равновесного диализа графическим методом Scatchard [14].

Полярограммы комплексов ЧСА—2,4-динитрофенол определяли на полярографе ЛП-7 (производство ЧССР) в реактиве Брди́чка (по [6]). Спектры флюоресценции белка в присутствии различных концентраций препарата исследовали на спектрофлуориметре «Hitachi-MPF» при длине волны возбуждающего света 280 нм. При этом концентрация ЧСА была стабильной и соответствовала $1 \cdot 10^{-5}$ М. Для введения поправок на реабсорбцию и экранирование [7] регистрировали спектры поглощения растворов 2,4-динитрофенола с белком в диапазоне длин волн возбуждения и максимума свечения на двухлучевом спектрофотометре «Schimadzu MLS-500».

Количественную оценку параметров комплексообразования по данным флюоресцентных исследований проводили методом, предложенным А. И. Луйком [8]. Согласно данному методу конечное выражение закона действующих масс приобретает вид:

$$C \left(\frac{1}{r} - 1 \right) = \frac{1}{K} + N(1 - r), \quad (1)$$

где C —общая молярная концентрация лиганда по отношению к концентрации белка; K —константа ассоциации; N —число мест связывания; r —степень насыщения белка веществом, определяемая методом флюоресценции как отношение изменений исследуемых показателей флюоресценции при каждой концентрации лиганда к их максимальному смещению в диапазоне завершеного конформационного перехода.

Результаты и их обсуждение

Методом равновесного диализа показано, что 2,4-динитрофенол активно связывается с белками цельной сыворотки крови и ЧСА. На основании полученных результатов равновесного диализа построены изотермы связывания (рис. 1, а), которые свидетельствуют о том, что взаимодействие вещества с белками сыворотки крови полностью обусловлено связыванием его альбумином. Установлено также, что γ -глобулин, β -липопротеид и α -гликопротеид не связываются с 2,4-динитрофенолом. Следовательно, основным компонентом сыворотки крови, взаимодействующим с 2,4-динитрофенолом, является альбумин.

В связи с этим дальнейшие исследования были направлены на изучение процессов взаимодействия 2,4-динитрофенола с альбумином. Количественное определение параметров комплексообразования графиче-

ским методом Scatchard на основании результатов равновесного диализа (рис. 1, б) показало, что аффинитет связи 2,4-динитрофенола с ЧСА невелик. Константа ассоциации составляет $1,65 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$. При этом на одной молекуле альбумина способно фиксироваться 29 молекул вещества.

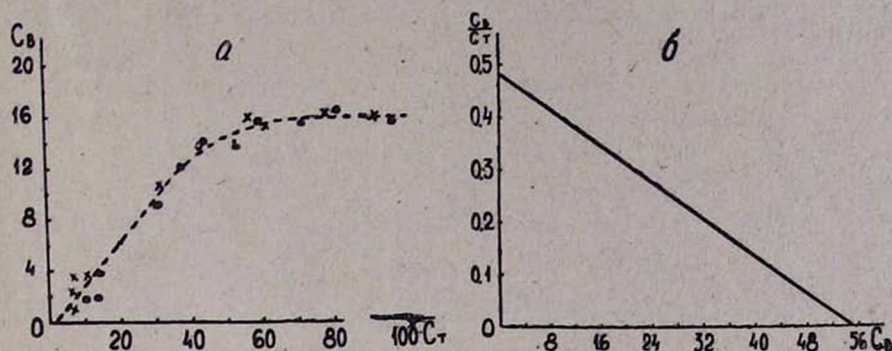


Рис. 1. а. Изотермы связывания 2,4-динитрофенола в цельной сыворотке человека (·) и растворе ЧСА (х). По оси абсцисс—общая концентрация препарата ($\times 10^{-5} \text{ M}$). По оси ординат—концентрация связанного с альбумином 2,4-динитрофенола ($\times 10^{-5} \text{ M}$). б. График Скетчарда для определения числа мест связывания и констант ассоциации при взаимодействии 2,4-динитрофенола с ЧСА. По оси абсцисс—концентрация связанного с альбумином 2,4-динитрофенола ($\times 10^{-5} \text{ M}$). По оси ординат—отношение концентраций свободной и связанной фракций 2,4-динитрофенола.

После получения этих данных было интересно изучить характер конформационных переходов молекулы альбумина при взаимодействии с 2,4-динитрофенолом методами полярографии и спектрофлуориметрии. Полученные полярограммы комплексов ЧСА-2,4-динитрофенол показали, что они практически не отличаются от таковых нативного альбумина. Это свидетельствует об отсутствии влияния изучаемого соединения на состояние тиоловых групп и дисульфидных связей белка, определяющих форму полярограмм.

Наряду с этим результатами люминесцентных исследований показаны закономерные изменения спектра флуоресценции ЧСА при добавлении к нему 2,4-динитрофенола, что характеризуется снижением интенсивности свечения белка (рис. 2 а). Изменение интенсивности флуоресценции белка (с поправкой на эффекты реабсорбции и экранирования) при связывании с 2,4-динитрофенолом свидетельствует об истинном конформационном переходе альбумина, который уже начинается при молярном соотношении ЧСА и препарата 1:1 и полностью завершается при соотношении—1:4. Конформационный переход молекулы альбумина сопровождается перемещением его триптофанового остатка во внутрь глобулы, т. е. в менее полярное окружение [1]. По-видимому, связывание альбумином 2,4-динитрофенола вначале приводит к образованию «гидрофобного кармана», где в дальнейшем и происходит фиксация молекул вещества.

Количественная оценка параметров комплексообразования (ЧСА-2,4-динитрофенол) по данным флуоресцентных исследований позволила установить наличие второго класса связывающих центров на белковой молекуле (рис. 2б). Взаимодействие 2,4-динитрофенола с этими центрами альбумина характеризуется значительно более сильным аффинитетом связи ($K_{\text{асс}}^{\text{II}} = 2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$). При этом каждая молекула альбумина имеет два места связывания ($N \approx 2$).

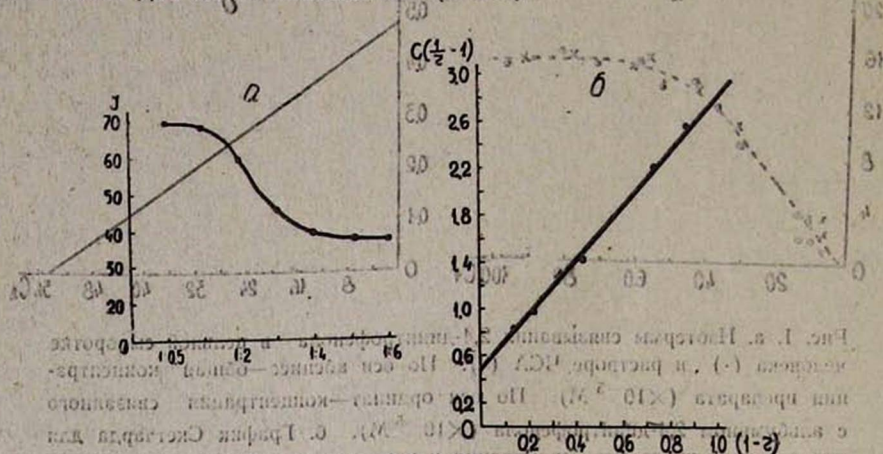


Рис. 2. а) Изменение интенсивности флуоресценции белка с поправкой на эффекты реабсорбции и экранирования при взаимодействии 2,4-динитрофенола с ЧСА. б) Графический анализ количественных параметров связывания 2,4-динитрофенола с ЧСА. Пересечение прямой с осью ординат соот-

ветствует константе диссоциации комплекса ($\frac{1}{K_{\text{асс}}}$), тангенс угла наклона прямой соответствует числу мест связывания (N); остальные обозначения см. в формуле 1.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что в результате взаимодействия только двух молекул 2,4-динитрофенола со специфическими центрами альбумина происходит конформационная перестройка («адаптация») структуры белка, что приводит впоследствии к образованию более емких центров связывания, фиксирующих порядка 29 молекул вещества, о чем свидетельствуют результаты люминесцентных исследований и данные равновесного диализа.

Таким образом, проведенные исследования позволили выяснить на молекулярном уровне механизм связывания 2,4-динитрофенола человеческим сывороточным альбумином, а также раскрыть особенности токсикокинетики данного вещества, что будет весьма ценным при разработке более совершенных методов диагностики и изыскании антидотно-лечебных средств при интоксикации этим соединением.

Лаборатория экспериментальной терапии ВНИИГИНТОКСа Поступила 11/II 1981 г.

2,4-ԴԻՆԻՏՐՈՖԵՆՈԼԻ ԿԱՊՈՒՄԸ ՄԱՐԴՈՒ ԱՐՑԱՆ ԱՄԲՈՂՋԱԿԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ԵՎ ՆՐԱ ՍՊԻՏԱՅԻՆ ԲԱՂԱԴԻՐԱՄԱՍԵՐԻ ՀԵՏ

Ուսումնասիրված է 2,4-դինիտրոֆենոլի փոխազդեցությունը մարդու արյան ամբողջական շիճուկի և նրա սպիտային բաղադրամասերի հետ հալման արակալելիության դիալիզի, սպեկտրոֆոտոմետրիայի և բևեռագրության մեթոդներով: Հաստատված է, որ արյան շիճուկի հիմնական բաղադրամասը, որը կապում է 2,4-դինիտրոֆենոլը, հանդիսանում է ալբումինը, որի մոլեկուլում հայտնաբերված են կապող կենտրոնների երկու դաս: Ցույց է տրված, որ 2,4-դինիտրոֆենոլի կապումը կատարվում է մարդու արդեն ձևափոխված շիճուկային ալբումինի կառուցվածքի վրա նյութի երկու մոլեկուլի և սպիտակուցի մոլեկուլի որոշակի ռեցեպտորների հետ փոխազդեցության հետևանքով:

V. D. LOUKYANCHOUK

DEFLECTION OF 2,4-DINITROPHENOL BY THE WHOLE BLOOD SERUM AND ITS ALBUMINOUS FRACTIONS

The interaction of 2,4-dinitrophenol with the whole blood serum and its albuminous fractions has been studied. It is demonstrated that the main serum component, being in interaction with this substance, is albumin. The main quantitative parameters of the complex development are established.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Буриштейн Э. А. Собственная люминесценция белка. Итоги науки и техники. Биофизика, т. 7. М., 1977.
2. Быховская М. С., Гинзбург С. Д., Хализова О. Д. Методы определения вредных веществ в воздухе. М., 1966.
3. Винникова А. В., Тринус Ф. П., Денисов Н. Д., Луйк А. И. Фармакология и токсикология, 1980, 2, стр. 187.
4. Вредные вещества в промышленности (под ред. Н. В. Лазарева и Э. Н. Левиной), т. 2. Л., 1976.
5. Гейтман И. Я. Антибиотики, 1976, 3, стр. 248.
6. Иванов И. Д., Рахлеева Е. Е. Полярография структуры и функции биополимеров. М., 1968.
7. Лихтенштейн Г. И., Писоваров А. И., Смолина Н. Б. Молекулярная биология, 1968, 3, стр. 291.
8. Луйк А. И., Новикова Н. В. Фармакология и токсикология, 1980, 5, стр. 593.
9. Маркович М. Н., Ландау М. А., Рудзит Э. А. Антибиотики, 1977, 10, стр. 901.
10. Сергеев П. В. Рентгеноконтрастные средства. М., 1971.
11. Ульяновская Т. И., Шимановский Н. Л., Иванов Л. В. Фармакология и токсикология, 1976, 6, стр. 747.
12. Чегер С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест, 1975.
13. Coffin E. e. a. J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 465.
14. Scatchard J. Ann. N. J. Acad. Sci., 1949, 51, 660.