

Г. В. Тарадина, О. И. Доценко

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ВИБРАЦИИ НА ИНАКТИВАЦИЮ РАСТВОРОВ ФЕРМЕНТА КАТАЛАЗЫ

Донецкий национальный университет; 83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46
galya@dongu.donetsk.ua

Тарадина Г. В., Доценко О. И. Исследование влияния низкочастотной вибрации на инактивацию растворов фермента каталазы. – В статье рассмотрено влияние низкочастотных механических колебаний на растворы каталазы различной концентрации и pH. Для описания процесса инактивации под действием вибрационного фактора предложена кинетическая схема, которая позволяет учесть все стадии диссоциации, сопровождающиеся потерей функциональных свойств фермента. Рассчитаны концентрации всех форм фермента, образующихся в процессе вибрации, и константы скорости инактивации ($k_{ин}, c^{-1}$). Установлено, что величины констант инактивации зависят как от частоты вибрации, так и от pH и концентрации исследуемых растворов. Обсуждается роль растворителя (водной среды) в инактивации каталазы под действием низкочастотной вибрации.

Ключевые слова: каталаза, инактивация, низкочастотная вибрация.

Введение

Практически все биологические объекты подвержены воздействию механических колебаний как постоянно действующего фактора окружающей среды. Опыт последних десятилетий показывает, что по мере совершенствования машин, механизмов, приборов и создания принципиально новых видов техники проблема вибрации и шума, порождаемого вибрациями, приобретает особую остроту. Создание высокоскоростных машин и транспортных средств, форсированных по рабочим параметрам (мощности, производительности, нагрузке), неизбежно приводит к увеличению интенсивности вибрационных и виброакустических полей, оказывающих негативное воздействие на биологические объекты на всех уровнях организации, в том числе и на организм человека. И если проблема влияния ультразвука широко освещена в литературе, то исследованию низкочастотных составляющих и инфразвука, который является относительно новым, не полностью изученным фактором среды, практически не уделяется внимания.

Чтобы выявить источник патологии, так называемую "мишень" воздействия механических колебаний, необходимо исследовать биологические объекты на молекулярном уровне. Нами в качестве объекта исследования влияния низкочастотной вибрации был выбран фермент каталаза, являющийся одним из компонентов защитной системы организма человека и животных от токсичных метаболитов кислорода – супероксидного аниона O_2^- и пероксида водорода H_2O_2 . Широкое распространение каталазы во всех тканях организмов и наличие ее во всех внутриклеточных структурах этих тканей, а также отсутствие литературных данных о чувствительности этого фермента к вибрационному фактору послужило поводом для постановки наших экспериментов. *Цель работы* – кинетическое исследование инактивации каталазы под действием низкочастотной вибрации.

Материалы и методы исследований

При проведении эксперимента использовали растворы каталазы печени быка (КФ 1.11.1.6) с оптическим показателем чистоты $RZ = A_{405}/A_{280} = 0,68$ (ООО "Синбиас", Украина), доводимые до нужной концентрации 0,1 М К-Na-фосфатным буфером. Концентрацию каталазы определяли спектрофотометрически, используя при расчетах коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{405} = 324000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Растворы каталазы различной концентрации ($1 \cdot 10^{-6}$, $0,5 \cdot 10^{-6}$, $0,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) с pH 6,4 ÷ 8,0 подвергали действию трехчасовой вибрации с амплитудой $1,2 \pm 0,27$ мм и частотой 8, 16, 24 и 32 Гц с помощью электромеханического преобразователя, подключенного к генератору сигналов. Каждые 15 мин из растворов отбирали аликвоты для определения активности фермента. В качестве контроля использовали каталазную активность этих же растворов, определенную до начала вибрации.

Для определения активности каталазы, а также констант скоростей расщепления H_2O_2 первого порядка, являющихся количественной характеристикой активности фермента, использовали метод, основанный на способности бихромата калия при нагревании в присутствии перекиси водорода превращаться в уксусной кислоте в ацетат хрома, с образованием перхромовой кислоты как неустойчивого промежуточного продукта. Образовавшийся ацетат хрома определяли колориметрически при длине волны 590 нм.

Активность каталазы определяли в терминах константы скорости разложения перекиси водорода первого порядка k , c^{-1} : $k = \frac{1}{t} \lg \frac{S_0}{S}$, где S_0 – начальная концентрация перекиси, S – концентрация перекиси в момент времени t , с ($t = 120$ с).

Результаты и обсуждение

При проведении серии экспериментов по влиянию низкочастотной вибрации на фермент каталазу было выявлено снижение каталазной активности при воздействии механических колебаний во всем диапазоне частот на все исследуемые растворы фермента.

Вибрация растворов с рН 6,4 не приводила к значительному снижению активности по отношению к контролю и составляла 5-14%, что, по всей видимости, вызвано изначально низкой активностью фермента при данном рН – фермент частично диссоциирует в растворе уже до воздействия фактора.

При вибрации растворов каталазы на частотах 8 и 32 Гц, а также концентрированных растворов с рН 7,4 на частоте 24 Гц инактивация была менее выраженной по сравнению с изменением активности фермента в диапазоне частот 16-24 Гц, а при вибрации растворов на частоте 16 Гц (снижение активности по отношению к контролю достигало 40-75%) уже через 30 минут от начала эксперимента наблюдали выпадение осадка, свидетельствующего о необратимой денатурации фермента.

Графики зависимости изменения каталазной активности по отношению к контролю от времени вибрации имели ступенчатый характер (рис. 1), свидетельствующий о диссоциативном характере инактивации.

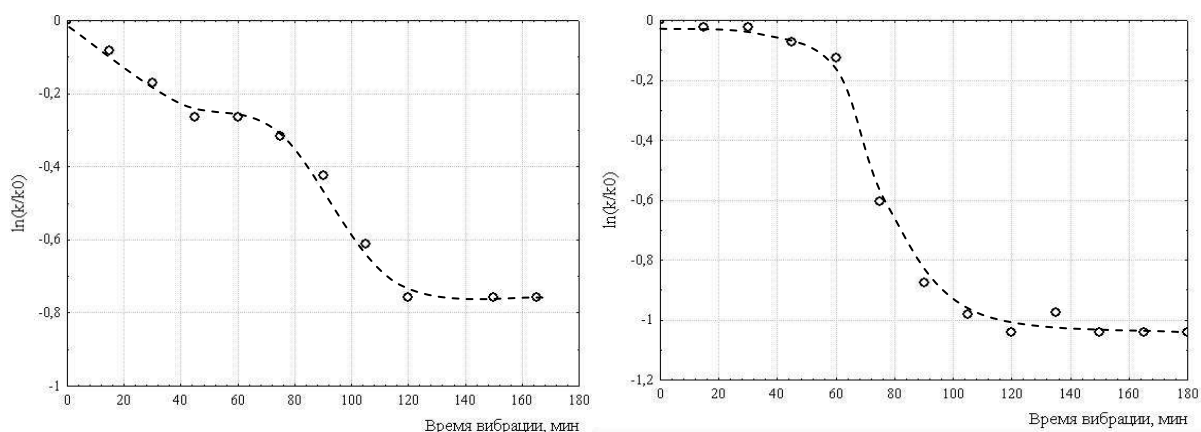
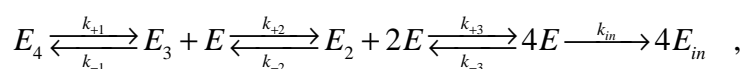


Рис. 1. Примерный вид экспериментальных кинетических зависимостей изменения активности каталазы от времени вибрации

При обработке полученных кинетических зависимостей с применением методов компьютерного моделирования было выяснено, что наиболее адекватно описывает результаты эксперимента модель инактивации каталазы через стадии последовательной диссоциации с образованием промежуточных активных форм фермента:



где E_4 , E_3 , E_2 , E – активные тетра-, три-, ди- и мономерная формы каталазы, E_{in} – неактивный мономер.

В результате моделирования были рассчитаны концентрации всех форм фермента, образующиеся в процессе вибрации растворов каталазы. При вибрации растворов с рН 7,4 на частоте 8 Гц и растворов с рН 7,0 и 7,4 на частоте 32 Гц наблюдали незначительное снижение содержания тетрамерной формы в процессе воздействия фактора (рис. 2 а). Вибрация растворов каталазы с рН 8,0 на этих же частотах и растворов с рН 7,0 на частоте 8 Гц приводила к уменьшению нативной формы, появлению тримера и в незначительной степени ди- и мономерных форм (рис. 2 б).

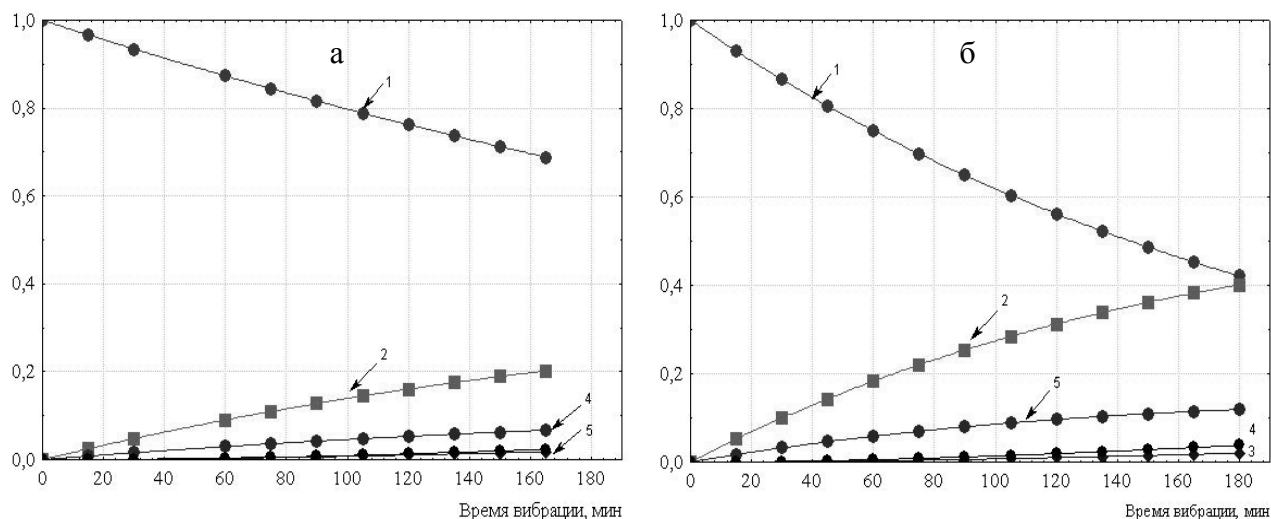


Рис. 2. Зависимость концентраций форм фермента от времени вибрации: 1 – нативная каталаза (E_4), 2 – тримерная форма (E_3), 3 – димер (E_2), 4 – мономер (E), 5 – неактивный мономер (E_{in}); а) рН 7,4, частота 8 Гц, б) рН 7,0, частота 8 Гц. $C_{кат} = 5e-7$ моль/л

Вибрация растворов каталазы в диапазоне частот 16-24 Гц приводила к резкому снижению содержания тетрамерной формы фермента и образованию три- и, в меньшей степени, ди- и мономерных форм. По мере воздействия вибрационного фактора происходило накопление неактивной мономерной формы каталазы. Надо заметить, что, как и в предыдущих исследованиях [1], степень диссоциации фермента зависела от концентрации исследуемых растворов во всем исследуемом диапазоне рН и была максимальной при вибрации растворов с концентрацией $2 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Это подтверждается и результатами компьютерного моделирования (рис. 3): доля инактивированной формы увеличивалась с уменьшением концентрации растворов каталазы.

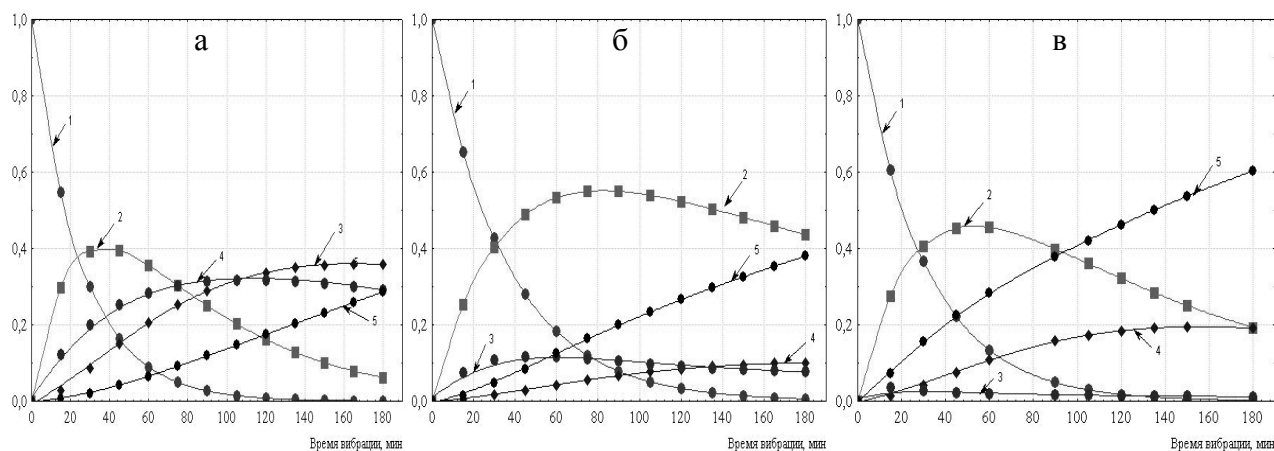


Рис. 3. Зависимость концентраций форм каталазы от времени вибрации: 1 – нативная каталаза (E_4), 2 – тримерная форма (E_3), 3 – димер (E_2), 4 – мономер (E), 5 – неактивный мономер (E_{in}). Концентрация каталазы: а) $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, б) $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, в) $2 \cdot 10^{-7}$ моль/л (частота 16 Гц; рН раствора 8,0)

Для всех условий эксперимента с применением методов поисковой оптимизации рассчитаны константы инактивации каталазы. Зависимость полученных констант инактивации от рН исследуемых растворов и частоты вибрации для различных концентраций фермента представлена на рис. 4 а-в. В граничных областях рН 7,0 и 8,0 константы инактивации имели ббльшие значения, нежели в так называемой "зоне стабильности" (рН 7,4) при вибрации во всем диапазоне частот. Максимальные значения констант инактивации получены при вибрации растворов на частотах 16 и 24 Гц.

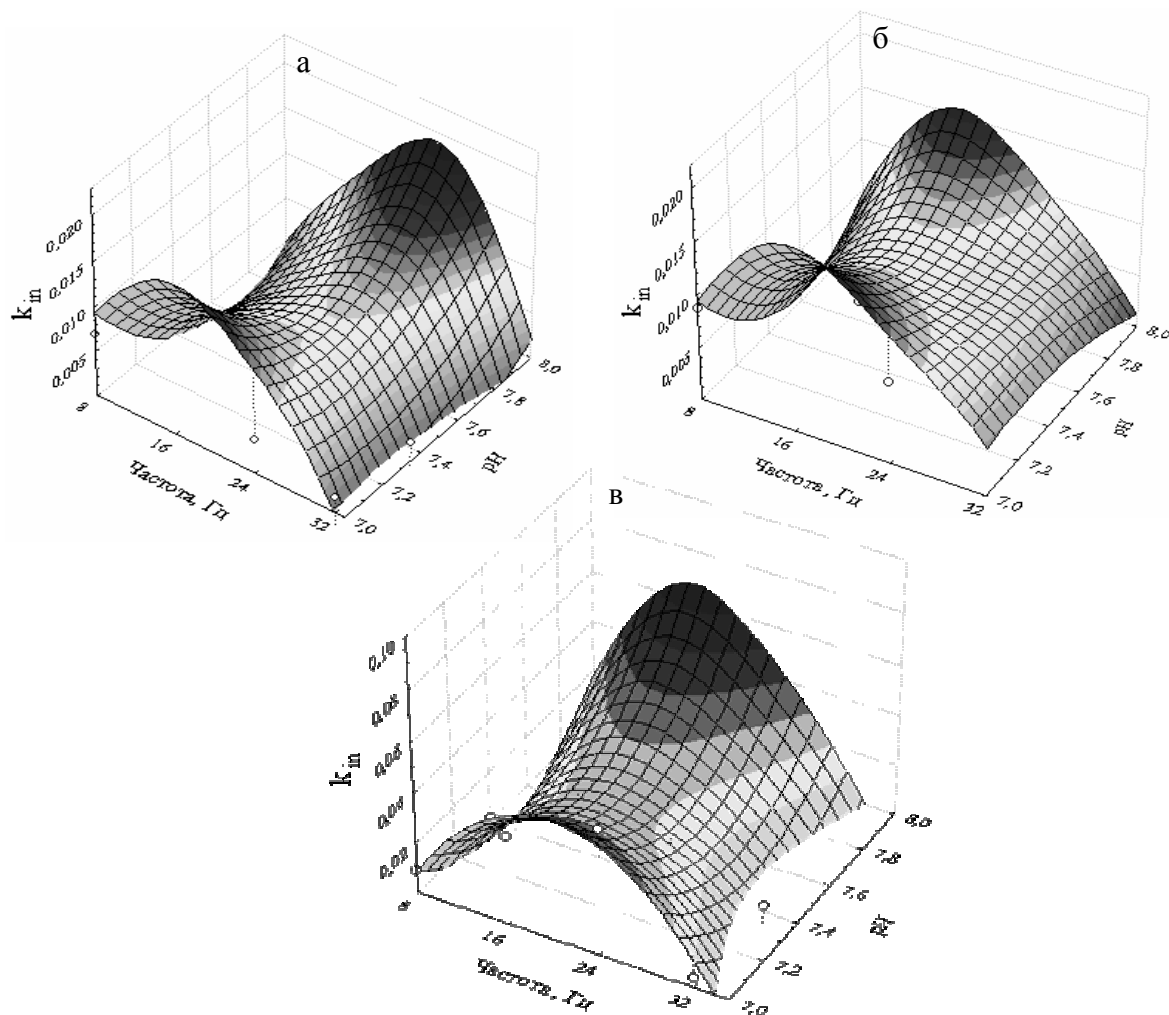


Рис. 4. Зависимость констант инактивации (k_{in}) от частоты и рН растворов каталазы. Концентрация каталазы: а) $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, б) $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, в) $2 \cdot 10^{-7}$ моль/л

При высоких концентрациях фермента при прочих равных условиях k_{in} минимальны. Это, по всей видимости, вызвано способностью фермента к самоассоциации – образовавшиеся агрегаты менее подвержены воздействию механических колебаний. Можно предположить, что определенную роль в исследуемых в работе процессах играет растворитель, а в нашем случае – буферный раствор.

В настоящее время наряду с развитием представлений и моделей, объясняющих влияние слабых физических факторов (магнитные поля; видимый свет, лазерное излучение; тепловое воздействие, фазовые переходы; механическое воздействие - вибрация, ультразвук; высокое или пониженное давление; сочетание двух и более перечисленных факторов) на системы и процессы в организме или живой клетке, высказываются суждения о том, что часть биологических эффектов может быть связана с действием этих факторов на свойства самой воды, а в нашем случае растворителя. Иными словами, вода является сенсором слабых химических и физических воздействий, вызывающих изменение ее физико-химических свойств.

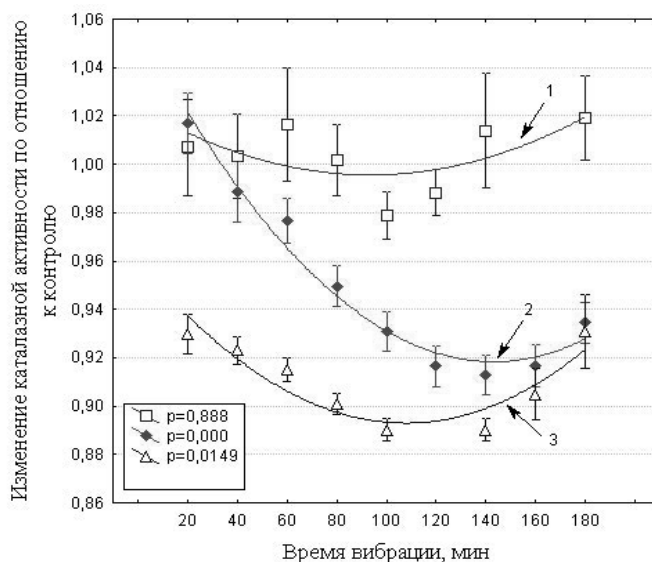


Рис. 5. Изменение каталазной активности по отношению к контролю от времени вибрации: 1 – раствор каталазы без вибрации; 2 – вибрация раствора каталазы; 3 – добавление каталазы в буфер после вибрации

Чтобы доказать предполагаемое опосредованное влияние механических колебаний на инактивацию фермента через растворитель, нами был проведен следующий эксперимент: каталазу, добавляли в буферный раствор после воздействия на него трехчасовой вибрации. При этом каталазная активность резко снижалась ($p < 0,05$) в течение первых 20 минут после добавления фермента (рис. 5). Для сравнения на графике приведены кинетические кривые изменения активности каталазы в процессе трехчасовой вибрации – получали типичную кривую инактивации, и без действия на растворы механических колебаний – достоверных различий в значениях величин активности каталазы не обнаружено ($p > 0,05$).

Из литературных источников известно, что буферный раствор насыщен воздухом, что обеспечивает наличие в нем кислорода порядка 10^{-4} М. Имеется ряд наблюдений [3], свидетельствующих об увеличении содержания АФК в водных средах при встряхивании воды, а также других низкоэнергетических воздействиях. Предполагается, что первичным актом низкоэнергетических воздействий может быть возбуждение молекул кислорода, растворенного в воде или находящегося в газовых пузырьках. В диспергированных в воде парогазовых пузырьках возбуждение кислорода (~ 1 эВ) может происходить в результате деформации поверхности и появления вблизи нее высоких градиентов электромагнитных полей даже при обыкновенном встряхивании или переливании воды.

Напряженность электрического поля, возникающего при деформации и расщеплении пузырьков, может достигать высоких значений, достаточных для возбуждения газообразного кислорода или паров воды. Возбужденный "синглетный" кислород приводит к появлению супероксидного анион-радикала, т.е. избыточного отрицательного заряда внутри пузырька. Взаимодействие заряженных пузырьков может приводить к синхронизации колебаний находящихся в них зарядов и установлению единого ритма колебаний в окружающих пузырьки водных объемах [3]. Этот эффект может лежать в основе усиления коллективных взаимодействий в воде при увеличении содержания активных форм кислорода (АФК).

Важным доводом в пользу гипотезы образования АФК при воздействии низкочастотной вибрации послужил анализ изменения активности каталазы в бескислородных растворах фермента.

Активность фермента измеряли до и после трехчасовой вибрации раствора каталазы в кислородсодержащих растворах в открытом сосуде; в плотно закрытом сосуде – без воздуха над свободной поверхностью жидкой фазы (чтобы если не исключить, то свести к минимуму возможность протекания процессов, происходящих не в воде, а на границе раздела "вода-

воздух", где имеются доступные источники энергии, достаточной для образования АФК) и в бескислородных растворах каталазы (насыщенном азотом и вакуумированном).

В первых двух случаях, при вибрации кислородсодержащих растворов, наблюдали снижение активности фермента на 56,3% по сравнению с контролем (в качестве контроля служила активность каталазы, определенная до начала вибрации). В бескислородных растворах значения активности каталазы не менялись (находились в пределах ошибки эксперимента), что позволяет предположить образование при встряхивании водных растворов активных форм кислорода, способных рекомбинировать с образованием свободных радикалов, которые атакуют поддерживающие нативную структуру аминокислотные остатки и снижают функциональные возможности ферментов.

Для доказательства влияния свободных радикалов на процесс инактивации каталазы в исследуемые растворы добавляли альбумин, диметилформамид и этанол, являющиеся специфическими "ловушками" гидроксильных радикалов $\text{HO}\cdot$ – наиболее реактивного вида "активированного" кислорода. Все используемые "ловушки" в большей или меньшей степени, как уже было показано ранее [1], оказывали стабилизирующее действие на растворы каталазы, подвергавшиеся вибрации. Причем степень инактивации и, соответственно, константы скорости инактивации снижались с увеличением концентрации сквенджеров (рис. 6).

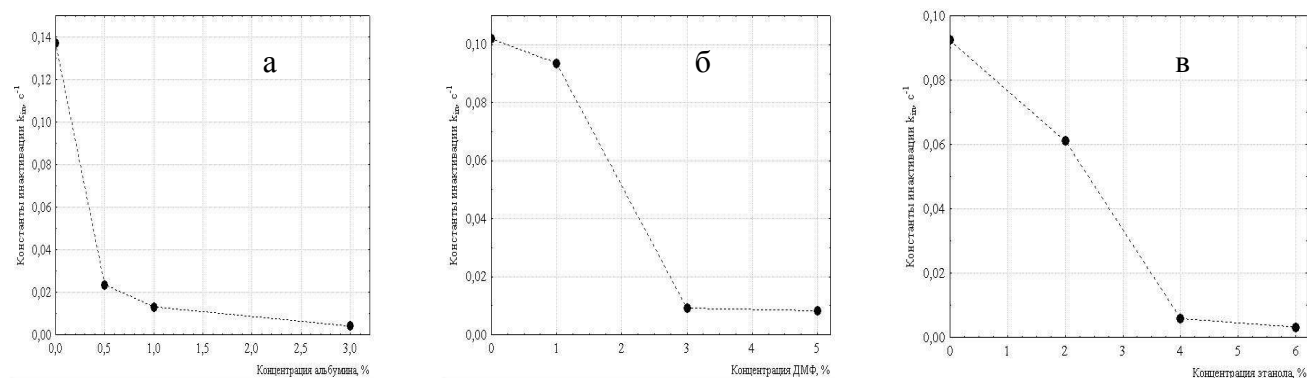


Рис. 6. Зависимость констант инактивации каталазы от концентрации ловушек радикалов: а) альбумина, б) диметилформамида, в) этанола

Выводы

1. Проведено кинетическое исследование процесса инактивации каталазы в растворах с рН 6,4; 7,0; 7,4; 8,0 при воздействии механических колебаний в диапазоне частот $8\div 32$ Гц с амплитудой $1,2 \pm 0,27$ мм. Максимальное снижение активности фермента наблюдали при вибрации разбавленных растворов на частотах 16 и 24 Гц.

2. Предложена кинетическая схема инактивации через стадии последовательной диссоциации фермента на субъединицы с образованием активных промежуточных форм; методами математического моделирования и оптимизации получены константы вибрационной инактивации каталазы и концентрации всех форм фермента, образующихся в процессе воздействия механических колебаний.

3. Показано опосредованное воздействие низкочастотных колебаний на каталазу через растворитель – буферную среду в результате образования активных форм кислорода под действием вибрации, способных рекомбинировать с образованием радикалов, разрушающих нативную структуру и снижающих функциональные свойства фермента.

Список литературы

1. Тарадина Г. В., Доценко О. И. Кинетическое исследование инактивации фермента каталазы под действием низкочастотной вибрации // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – Донецк: ДонНУ, 2006. – Вып. 6. – С. 251-256.

2. Лобышев В. И. Вода как сенсор слабых воздействий физической и химической природы. // Рос. хим. журн. – 2007. – Т. LI, № 1. – С. 107-114.

3. Белолова Л. В., Глушков М. В. Влияние активных форм кислорода и диспергированных газовых пузырьков на флуоресценцию воды и водных растворов глицилтриптофана // Электронный научн. журн. "Исследовано в России". – 2006. – С. 2040-2057 (<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2006/215.pdf>).

Тарадіна Г. В., Доценко О. І. Дослідження впливу низькочастотної вібрації на інактивацію розчинів ферменту каталази. – У статті розглянуто вплив низькочастотних механічних коливань на розчини каталази різної концентрації та рН. Для опису процесу інактивації під дією вібраційного фактора запропоновано кінетичну схему, що дозволяє врахувати всі стадії дисоціації, які супроводжуються втратою функціональних властивостей ферменту. Розраховані концентрації всіх форм ферменту, що утворюються в процесі вібрації і константи швидкості інактивації (k_{in} , s^{-1}). Встановлено, що значення констант інактивації залежать як від частоти вібрації, так і від рН і концентрації досліджуваних розчинів. Обговорюється роль розчинника (водного середовища) в інактивації каталази під впливом низькочастотної вібрації.

Ключові слова: каталаза, інактивація, низькочастотна вібрація.

Taradina G. V., Dotsenko O. I. The investigation of the influence of the low-frequency vibration on inactivation of the enzyme catalase solutions. – The influence of low-frequency mechanical fluctuations on catalase solutions with various concentration and pH is considered in the work. The kinetic scheme, which allows to consider all stages of dissociation, accompanied by loss of functional properties of the enzyme is offered for the description of the process. The concentrations of all species of the enzyme produced under the influence of the vibration and the constants of the speed of inactivation (k_{in} s^{-1}) are calculated. It is established, that the sizes of constants of the inactivation depend as of frequency of vibration, as of pH and concentration of investigated solutions. It is discussed the role of solvent (water environment) in the catalase inactivation under the action of the low-frequency vibration.

Key words: catalase, inactivation, low-frequency vibration.