

УДК 577.15.03

БИОФИЗИКА

Академик Н. Д. ДЕВЯТКОВ, В. В. ХРАПОВ, Р. Э. ГАРИБОВ,
В. А. КУДРЯШОВА, В. И. ГАЙДУК, Г. Ф. БАКАУШИНА,
А. М. ХРАНКО, А. А. ЛЕВИНА, А. П. АНДРЕЕВА

ВЛИЯНИЕ МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МАЛОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ГАММА-РЕЗОНАНСНЫЕ СПЕКТРЫ ГЕМОГЛОБИНА

В настоящее время установлен экспериментальный факт резонансного действия с.в.ч. (миллиметрового) облучения на гемоглобин (Hb), причем наиболее подробно на связь гем—белок (¹⁻⁴). Было высказано предположение (⁵), что эффект нетеплового резонансного воздействия на гемоглобин обусловлен изменением расположения отдельных структурных частей молекулы в активном центре Hb, т. е. в окрестности иона железа; результаты экспериментов (¹⁻⁴) не противоречат этой точке зрения.

Следует заметить, что в (¹⁻⁴) использовалась химическая методика анализа воздействия, разрушающая исследуемый образец. Поэтому более перспективным (с точки зрения понимания механизма воздействия) представляется использование современных физико-химических методов. Особенно интересны такие методы непосредственно в поле с.в.ч. колебаний. Одним из таких методов является гамма-резонансная спектроскопия ⁵⁷Fe, которая позволяет регистрировать, в частности, изменения в электронной конфигурации как в окружении, так и в самом ионе железа (см., например, (⁶)).

Наши экспериментальные результаты получены на свежеприготовленном лиофильно высушенном Hb крови крысы. Предварительно по специальной методике (⁷) производилось обогащение гемоглобина крысы изотопом ⁵⁷Fe. Схема установки изображена на рис. 1. Облучение с.в.ч. колебаниями проводилось с помощью клистрона. При длине волны $\lambda=7,1$ мм мощность излучения составляла 8 мвт. Гамма-резонансные (г.р.) спектры снимались непосредственно в поле с.в.ч. излучения на мёссбауэровском спектрометре электродинамического типа. Источником резонансных гамма-квантов служил ⁵⁷Co активностью 10 мС, диффундированный в матрицу из хрома. Во время измерений источник γ -квантов находился при комнатной температуре. Изомерные сдвиги г.р. спектров приводятся относительно нитропруссиды натрия, экспериментальная ширина линии которого в наших измерениях была около 0,3 мм/сек. Поглотитель 3 (рис. 1), т. е. порошок Hb, помещался в специальную подложку из тефлона (брали ≈ 400 мг гемоглобина). Во всех измерениях поглотитель находился при комнатной температуре. Продолжительность с.в.ч. облучения варьировалась от 3,5 до 7,5 час.

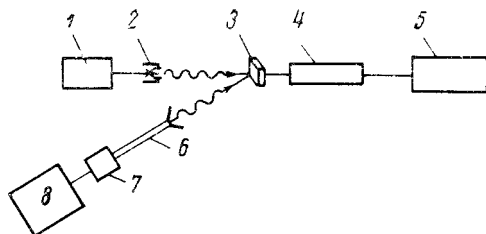
Полученные г.р. спектры поглощения представлены на рис. 2 и 3; из них были вычислены параметры г.р. спектров (см. табл. 1, где ε — величина эффекта, Γ — полуширина линии, к.р. — квадрупольное расщепление, и.с. — изомерный сдвиг).

Из анализа изомерного сдвига, который имеет отношение к электронной плотности на ядре железа и, следовательно, к электронной делокализации, а также из величины и температурной зависимости квадрупольного расщепления, который определяет в основном силу кристаллического

электрического поля, а, следовательно, и тип связи иона железа с окружающими лигандами, можно сделать соответствующие выводы.

На рис. 2 представлен типичный г.р. спектр, который присущ окси-Нб и представляет собой симметричный дублет (см., например, ⁽⁸⁾). Г.р. параметры этого спектра характеризуют низкоспиновое ($S=0$) ферро-состояние (электронная конфигурация $3d^6$) иона Fe^{2+} в сильном кристаллическом поле оксигемоглобина ⁽⁹⁾; в окси-Нб образуется прочная ковалентная

Рис. 1. Блок-схема установки. 1 — вибратор, 2 — источник гамма-квантов, 3 — образец, 4 — детектор, 5 — регистрирующая система. 6 — излучатель, 7 — источник СВЧ-излучения, клипстрон, 8 — блок питания клипстрона



связь между ионом Fe^{2+} и молекулой O_2 , приводящая, вероятно, к ослаблению связи * между азотом проксимального гистидина и ионом Fe^{2+} . В результате этого уменьшено * смещение иона Fe^{2+} из плоскости порфиринового кольца, а влияние четырех атомов азота значительно.

На рис. 3 представлены г.р. спектры гемоглобина, паходившегося под действием с.в.ч. облучения. Эти спектры обрабатывались на ЭВМ по методу наименьших квадратов в предположении существования четырех пиков (резонансов). Машинный анализ подтвердил это предположение.

Таблица 1

Параметры г.р. спектров до и после облучения

	Экспозиция, час.	N_0 дублета	и.с., мм/сек	к.р., мм/сек	α_1 , %	α_2 , %	Γ_1 , мм/сек	Γ_2 , мм/сек
До облучения	—	—	$0,37 \pm 0,05$	$1,80 \pm 0,05$	$2,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,05$
После облучения	7,5	1	$0,40 \pm 0,05$	$1,82 \pm 0,02$	$2,1 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$0,59 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,09$
с.в.ч. колебаниями	(рис. 3а)	2	$1,2 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,1$
	3,5	1	$0,33 \pm 0,02$	$1,82 \pm 0,02$	$2,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$0,77 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,1$
	(рис. 3б)	2	$1,0 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,9$

Как явствует из рисунка и табличных данных, первая пара линий представляет собой (в пределах экспериментальной ошибки) симметричный дублет, характеризующий исходный спектр окси-Нб, а вторая пара линий — асимметричный дублет с большими значениями и.с. и к.р. Появление асимметричного дублета с такими значениями и.с. и к.р. свидетельствует о том, что часть железа в Нб перешла в высокоспиновое ($S=2$) ферро-состояние.

Таким образом, воздействие с.в.ч. излучения на гемоглобин при комнатной температуре, по-видимому, приводит к одновременному существованию в Нб двух различных спиновых состояний иона Fe^{2+} . Наличие высокоспиновой ферро-формы в Нб указывает на ослабление ковалентной связи между ионом Fe^{2+} и молекулой O_2 , а, следовательно, на усиление связи между атомом азота проксимального гистидина и ионом Fe^{2+} .

После прекращения облучения через некоторое время, порядка нескольких суток, мёссбауэровский спектр Нб возвращается к исходному виду (рис. 2).

* По сравнению с деоксигемоглобином.

Весьма интересно, что данный метод гамма-резонансной спектроскопии ^{57}Fe подтвердил полученные в $(^{2-4})$ химическим путем данные об усилении связи гем-белок при длине волны $\lambda=7,1$ мм в образцах Нв в порошке.

Таким образом можно сделать следующие заключения. 1. Из г.р. спектров гемоглобина следует, что при $\lambda=7,1$ мм облучение с.в.ч. колебаниями малой мощности приводит к переходу части атомов железа в высокоспиновое ферро-состояние. Этот факт, вероятно, отражает изменение связи

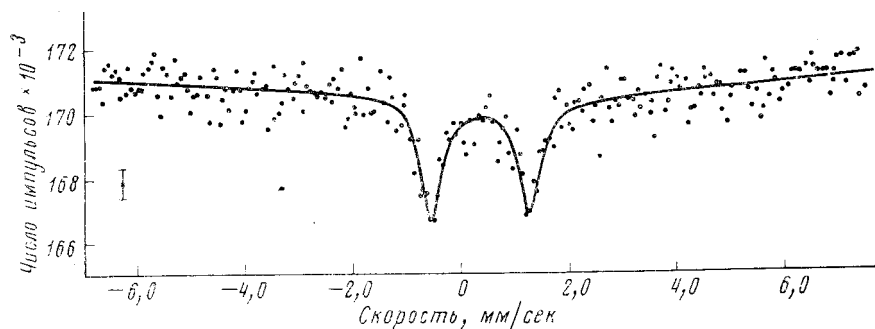


Рис. 2. Г.р. спектр гемоглобина до облучения, $T=298^\circ \text{K}$

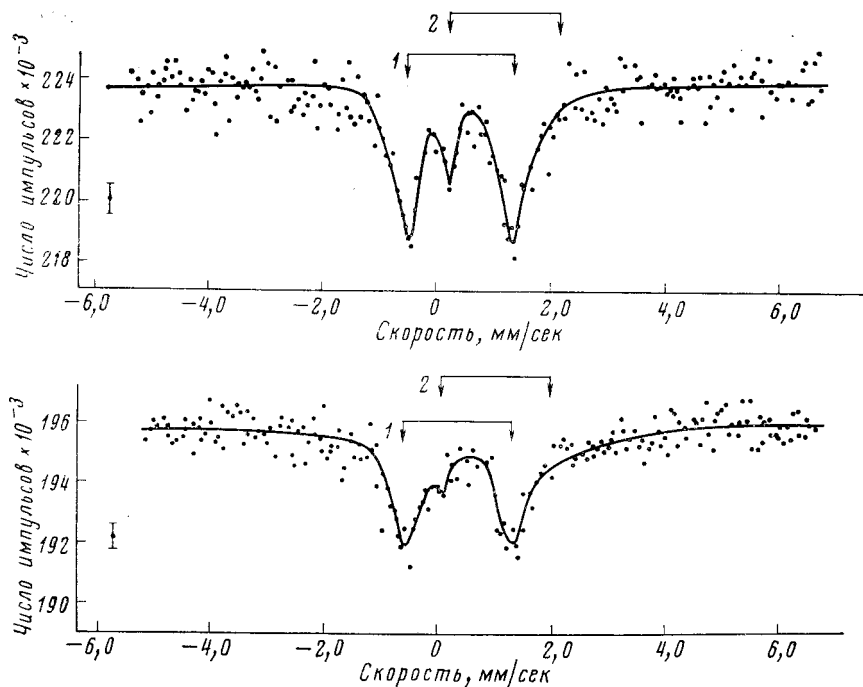


Рис. 3. Г.р. спектр гемоглобина, облученного с.в.ч. излучением при длине волны $\lambda=7,1$ мм, $T=298^\circ \text{K}$. 1 — длительность облучения 7,5 час, 2 — 3,5 час.

иона железа с окружающими лигандами, в частности, ослабление связи (при данной длине волны) с молекулой кислорода O_2 . 2. Это влияние с.в.ч. излучения на гемоглобин носит обратимый характер со значительным (несколько дней) временем жизни. 3. Поскольку и.с. и к.р. асимметричного дублета (см. рис. 3 и табл. 1) характерны для высокоспинового иона Fe^{2+} , а не для высокоспинового иона Fe^{3+} , полученные данные свидетельствуют также о том, что воздействие с.в.ч. излучения малой интенсивности на гемоглобин не приводит к его переходу из окси-формы в мет-форму. Такой переход (окси-мет) скорее всего имеет место при воздействии ин-

тенсивного с.в.ч. излучения (¹⁰), так же как он наблюдается при обычном нагреве (¹¹). 4. В данной работе впервые показана возможность применения тонких физических методов анализа воздействия с.в.ч. излучения на макромолекулы. Это позволяет детально изучать наблюдаемые изменения в локальных областях молекул.

Институт радиотехники и электроники
Академии наук СССР

Поступило
22 VII 1975

Институт биофизики
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Д. Девятков, Электронная техника, сер. 1, Электроника СВЧ, в. 4, 130 (1970).
² В. А. Кудряшова, С. А. Ильина и др. Исследование резонансного воздействия волн миллиметрового диапазона на гемоглобин, ИРЭ АН СССР, препринт № 115, М., 1972.
³ В. И. Гайдук, Ю. И. Хургин, В. А. Кудряшова, УФН, т. 110, 3, 466 (1973). ⁴ А. П. Андреева, М. Г. Дмитриева и др., Электронная техника, сер. 1, Электроника СВЧ, в. 11, 121 (1971). ⁵ Л. Г. Коренева, В. И. Гайдук, ДАН, т. 193, № 2, 465 (1970).
⁶ Химические применения мёссбауэровской спектроскопии, под ред. В. И. Гольданского и др., М., «Мир», 1970. ⁷ R. W. Grant, J. Q. Cape et al., Biophys. J., v. 7, 651 (1967).
⁸ V. Gonser, R. W. Grant, Biophys. J., v. 5, 768 (1965). ⁹ А. Траутвеин, А. Мейер и др., В сб. Структура и связь, М., «Мир», 1969, стр. 202. ¹⁰ Л. А. Афанасьева, В. И. Гайдук и др., Эффект нетеплового воздействия интенсивного микроволнового излучения на молекулу гемоглобина, ИРЭ АН СССР, препринт, М., 1971. ¹¹ Л. А. Блюменфельд, Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода, М., «Советская наука», 1957.