

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СТРУКТУРУ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ КРОВИ

Г. А. Залеская^{а*}, В. С. Улащик^б, Н. П. Митьковская^в,
О. В. Ласкина^в, А. В. Кучинский^а

УДК 538.311: 535.34

^а Институт молекулярной и атомной физики НАН Беларуси,
220072, Минск, просп. Независимости, 70; e-mail: zalesskaya@imaph.bas-net.by

^б Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

^в Белорусский государственный медицинский университет, Минск

(Поступила 19 июня 2007)

ИК фурье-спектры поглощения крови использованы для изучения изменений структуры глобулярных белков крови при экстракорпоральной аутогемомагнитотерапии, применявшейся для лечения ишемической болезни сердца. Сопоставлены спектры крови до и после магнитотерапии в областях: амид I (1655 см^{-1}), амид II (1545 см^{-1}), амид III ($1230\text{—}1350\text{ см}^{-1}$), амид IV и амид V ($400\text{—}700\text{ см}^{-1}$). Показано, что хорошо выраженные изменения спектров в указанных областях при прямом воздействии низкочастотного импульсного магнитного поля на кровь *in vivo* связаны с конформационными изменениями вторичной структуры глобулярных белков крови, которые проявляются в увеличении вклада α -геликальной конформации. Обсуждается инициированное магнитотерапией появление новых ИК полос поглощения при 1018 и 1038 см^{-1} и рост интенсивности ряда других полос, расположенных в области $1000\text{—}1200\text{ см}^{-1}$, что свидетельствует об изменении концентрации некоторых компонентов крови.

Ключевые слова: ИК спектр поглощения крови, низкочастотное магнитное поле, глобулярные белки, конформация белка.

*IR absorption spectra of blood were used to study the structure change of globular proteins at extracorporeal autohemomagnetics therapy applying for heart ischemia treatment. The spectra of blood before and after magnet-therapy were compared in the several regions: Amid I (1655 cm^{-1}), Amid II (1545 cm^{-1}), Amid III ($1230\text{—}1350\text{ cm}^{-1}$), Amid IV and V ($400\text{—}700\text{ cm}^{-1}$). It is shown that spectrum changes induced by direct magnetic field action on the blood *in vivo* are associated with the conformational changes in the secondary structure of blood globular protein, which manifest itself in a pronounced increase of the α -helical conformation content. The emergence of new absorption bands in the region $900\text{—}1200\text{ cm}^{-1}$ was observed for several samples after magnet-therapy due to the possible concentration changes of some blood components.*

Keywords: IR absorption spectra of blood, low-frequency magnetic field, globular protein, conformation of protein.

Введение. ИК спектроскопия принадлежит к числу экспериментальных методов, позволяющих изучать сложную структуру глобулярных белков, имеющих большое количество аминокислотных остатков [1, 2]. Совершенствование приборов и методов разделения полос в сложных ИК спектрах, состоящих из большого числа перекрывающихся полос, значительно расширило возможности ИК спектроскопии. В настоящей работе ИК фурье-спектроскопия использована для изучения влияния магнитного поля (МП) на структуру белковых макромолекул крови. Реакция макромолекул на воздействие МП представляет как фундаментальный [3], так и прикладной интерес [4]. Спектральные методы позволяют изучать первичные механизмы активированных МП процессов на молекулярном уровне, в том числе в случаях, представляющих интерес для практической медицины. В ряде работ (см., например, [5]) показано, что кровь обладает чувствительностью к МП, которое изменяет целый ряд ее свойств. Так, воздействие МП вызывает надежно установленные изменения гемокоагуляции, регионарной и периферической гемодинамики, изменение липидного состава крови и других ее характеристик. Однако выполненные к настоящему времени

EFFECT OF LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD ON STRUCTURE OF THE BLOOD GLOBULAR PROTEINS
G. A. Zalesskaya^{а*}, V. S. Ulaschyk^б, N. P. Mitkovskaya^в, O. V. Laskina^в, and A. V. Kuchinsky^а (^а Institute of Molecular and Atomic Physics, National Academy of Sciences of Belarus, 70 Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Belarus; e-mail: zalesskaya@imaph.bas-net.by; ^б Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk; ^в Belarusian State Medical University, Minsk)

работы не дают полного представления о физико-химических механизмах действия МП на кровь и путях преобразования действия МП в биологически целесообразную реакцию.

Методика эксперимента. Воздействие МП на кровь выполнялось методом экстракорпоральной аутогемагнитотерапии для 10 больных с острым коронарным синдромом. Использовался аппарат ГЕМО-СПОК (Беларусь), создававший импульсное МП с несущей частотой 10 Гц, внутриимпульсной частотой 40—60 Гц, индукцией 120 мТл между полюсами электромагнита. В процессе экстракорпоральной аутогемагнитотерапии кровь из вены отбиралась во флакон с антикоагулянтом (гепарином) через систему, часть которой помещалась между полюсами электромагнита. После окончания процедуры кровь возвращалась больному. Курс магнитотерапии состоял из пяти процедур длительностью 20 мин ежедневно.

Так как ИК спектры цельной крови сильно искажаются поглощением воды, для спектрального анализа образцы крови приготавливались двумя методами. В первом для регистрации спектров пропускания на подложке из KRS приготавливалась пленка крови микронной толщины так, чтобы оптическая плотность D наиболее интенсивных полос не превышала величину $D \approx 1$. С этой целью дозированные количества цельной крови, отмеряемые дозиметром, наносились на фиксированный участок оптических окон из KRS. ИК спектры пропускания приготовленных таким методом пленок исследовались в области 2—20 мкм. Во втором методе капля крови помещалась между двумя окнами из CaF_2 с образованием слоя жидкой крови толщиной несколько микрометров. Вычитание спектра жидкой воды по программе OMNIC позволяет получить спектр крови в области 1000—1700 см^{-1} . Спектры записывались на ИК-фурье-спектрометре (Nicolet, США) со спектральной шириной щели 2 см^{-1} при усреднении 256 сканирований. Разложение перекрывающихся полос на отдельные компоненты выполнялось с использованием процедуры сужения полос (фурье-деконволюции по программе OMNIC). Процедура деконволюции позволяет выявить скрытую структуру ИК полос поглощения [6]. Предварительно число и положение индивидуальных компонент каждой сложной полосы определялись по спектрам вторых производных. Во всех случаях при оценке влияния МП сопоставлялись спектры образцов крови с одинаковыми оптическими плотностями в максимуме полосы амид I.

Экспериментальные результаты и их обсуждение. Анализ ИК спектров относится к числу признанных методов определения структурных изменений в молекулах белков, так как ряд ИК полос поглощения пептидных групп чувствителен к конформационным изменениям макромолекул [1, 2, 7]. Известно, что глобулярные белки характеризуются четырьмя уровнями структурной организации макромолекул. Первичная структура определяется последовательностью расположения аминокислотных остатков полипептидной цепи. Вторичная или конформационная структура отражает пространственное положение молекулярных групп полипептидного остова и боковых цепей аминокислотных остатков. Третичная структура зависит от способов свертывания сегментов вторичной структуры в компактную молекулу, а при наличии нескольких полипептидных цепей их взаимное расположение определяет четвертичную структуру белка [8].

Анализ вторичной структуры белков крови. Для спектров поглощения крови характерно наличие интенсивных полос поглощения, относящихся к характеристическим колебаниям С=О- и NH-связей пептидной группы. Полоса амид I, принадлежащая преимущественно валентным колебаниям С=О-связи, самая интенсивная в ИК спектре крови. Согласно современным данным, большая полуширина и сложная структура этой полосы обусловлены прежде всего вкладом перекрывающихся полос различных конформеров, частоты валентных колебаний С=О-групп которых различаются для разных конформаций полипептидной цепи [1, 2]. Поэтому количественный анализ положения максимумов и интенсивностей отдельных компонент полосы амид I применялся нами для определения вторичной структуры полипептидных цепей так же, как в работах [1, 2, 6]. Следует указать, что форма и ширина этой полосы могут зависеть от полос поглощения С=О-групп как полипептидного скелета, так и боковых цепей аминокислотных остатков. Однако в работах [1, 9, 10] показано, что полоса амид I достаточно характеристична и ее спектральные параметры в малой степени зависят от строения боковых групп аминокислотных остатков, а следовательно, от происходящих в них изменений.

В спектрах крови форма контура и положение главного максимума ($\nu_{\text{макс}} = 1655 \text{ см}^{-1}$) полосы амид I соответствуют установленным для полос белков с преимущественным вкладом α -геликальной конформации полипептидной цепи [1, 2, 6]. К числу макромолекул крови, имеющих высокий вклад α -геликальной конформации в составе α - и β -субъединиц и высокую конформационную лабильность, относятся гемоглобин, количество которого в обезвоженной массе крови близко к 70 %, а также основные белки плазмы крови: альбумин и глобулин, составляющие 53 и 40 % всех белков плазмы соответственно. Для гемоглобина около 80 % аминокислотных остатков включены в спиральные α -участки полипептидной цепи, для альбумина 67 %. Высоочастотные (1681, 1695 см^{-1}) и низкочастотная (1642 см^{-1}) компоненты полосы амид I в спектрах глобулярных белков с высокой степенью α -спиральности отнесены к полосам поглоще-

ния C=O-групп коротких, не имеющих регулярной структуры участков полипептидной цепи, которые соединяют α -спиральные участки [1, 2, 7]. Однако в каждой из молекул глобулярных белков для таких соединяющих участков характерно жесткое и идентичное расположение атомов в пространстве.

Как следует из спектров крови (рис. 1), типичным результатом экстракорпоральной аутогемомангнитотерапии является высокочастотный сдвиг полосы амид I (рис. 1, *a*, спектры 1 и 2), а также убывание интенсивностей ее низкочастотной (1642 см^{-1}) и высокочастотной (1681 см^{-1}) компонент (спектры 3 и 4). Отметим, что инициированные МП изменения по величине отличались для разных пациентов. Наиболее сильные спектральные изменения наблюдались в образцах крови больных, для которых при экстракорпоральной аутогемомангнитотерапии достигнут хорошо выраженный положительный клинический эффект.

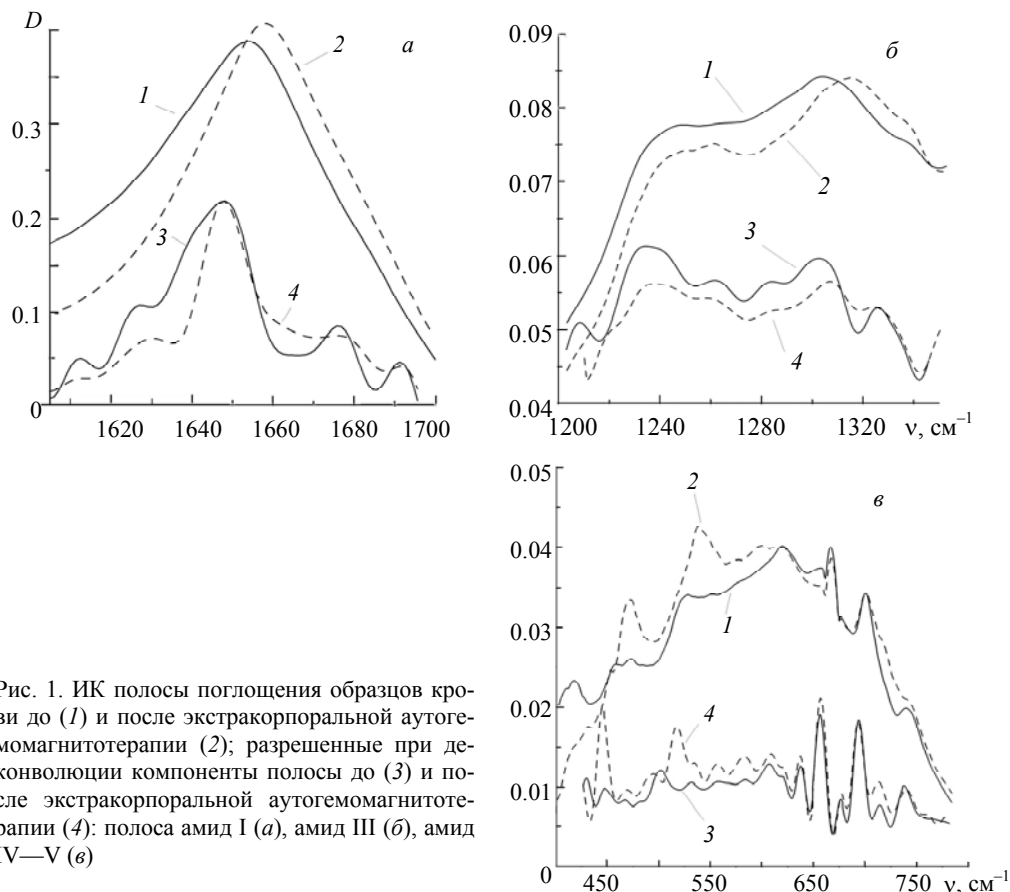


Рис. 1. ИК полосы поглощения образцов крови до (1) и после экстракорпоральной аутогемомангнитотерапии (2); разрешенные при деконволюции компоненты полосы до (3) и после экстракорпоральной аутогемомангнитотерапии (4): полоса амид I (*a*), амид III (*б*), амид IV—V (*в*)

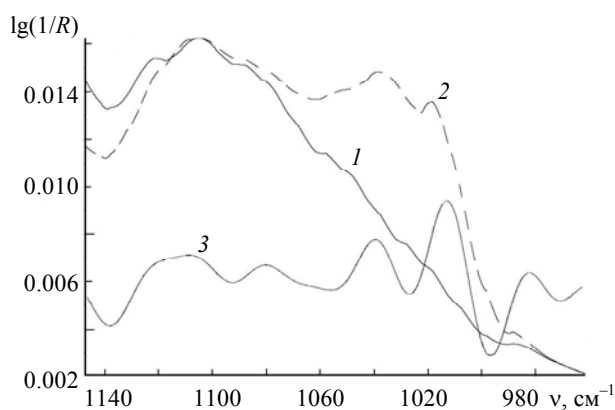
Воздействие МП вызывало также изменения ИК спектров крови в области амид III ($1220\text{—}1350\text{ см}^{-1}$) (рис. 1, *б*, спектры 1 и 2). В этом спектральном интервале проявляются полосы NH-деформационных и CN-валентных колебаний полипептидного скелета, зависящие от особенностей вторичной структуры. Как показано в [11], соотношение интенсивностей двух перекрывающихся полос 1310 и 1240 см^{-1} изменяется в зависимости от конформационной структуры полипептидной цепи. Более интенсивная компонента с $\nu_{\text{макс}} = 1310\text{ см}^{-1}$ отнесена в [11] к полосе поглощения α -геликальной конформации полипептидного остова, а компонента с максимумом при 1240 см^{-1} — к поглощению молекулярных групп с растянутых участков полипептидной цепи. Эти полосы включают в себя две менее интенсивные компоненты с максимумами при 1283 и 1263 см^{-1} (спектры 3 и 4), которые присутствуют в спектрах различных глобулярных белков. Полосы при 1283 и 1263 см^{-1} так же, как полоса 1240 см^{-1} , не связаны с поглощением молекулярных групп полипептидной цепи, образующих α -геликальную структуру [11]. После воздействия экстракорпоральной аутогемомангнитотерапии наблюдалось увеличение интенсивности полосы при 1312 см^{-1} и понижение интенсивности всех трех полос (1238 , 1263 и 1283 см^{-1}), не связанных с поглощением α -геликальной конформации. Анализ полос амид I и амид III позволяет сделать вывод, что воздействие МП приводит к изменению вторичной структуры глобулярных белков крови с увеличением вклада α -геликальной конформации.

ИК спектры в области $400\text{—}900\text{ см}^{-1}$ также анализировались на наличие конформационных изменений в структуре белков крови при экстракорпоральной аутогемомангнитотерапии. В низкочастотной облас-

ти ИК спектр, как известно, сильно зависящий от пространственной структуры макромолекул и их взаимного расположения, существенно отличается для разных конформаций [1, 12]. В спектральном интервале 400—900 см^{-1} расположены конформационно-чувствительные полосы скелетных колебаний полипептидной цепи глобулярных белков: полоса амид IV, которая для спиральной конформации проявляется в интервале 597—620 см^{-1} , и амид V (720 см^{-1}). В спектрах крови после экстракорпоральной аутогемамагнитотерапии отмечен рост интенсивности полосы амид IV (рис. 1, в, спектры 1 и 2). Эффект МП более выражен в разрешенной структуре полосы (спектры 3 и 4). Рост интенсивности полосы при 470 см^{-1} , отнесенной в [1] к плоскому деформационному колебанию С=О-группы с изгибом связей боковых радикалов, и интенсивности полосы при 540 см^{-1} свидетельствует об изменениях вторичной структуры полипептидных цепей.

Анализ изменений третичной структуры. Для анализа возможных изменений третичной структуры макромолекул крови, инициированных экстракорпоральной аутогемамагнитотерапией, сопоставлены частоты и относительные интенсивности разрешенных при деконволюции компонент полосы амид II: 1590, 1576, 1542, 1515 и 1501 см^{-1} . Эти полосы поглощения обусловлены как деформационными колебаниями NH-групп пептидной цепи, так и колебаниями атомных групп боковых цепей некоторых аминокислотных остатков (например, групп NH_2 , ионизованных карбоксильных групп COO^- , колебаний фенильного кольца гистидина и феназина), и характерны для глобулярных белков [10]. Сопоставление ИК спектров образцов крови одного и того же пациента до и после экстракорпоральной аутогемамагнитотерапии показало отсутствие существенных изменений относительных интенсивностей полос молекулярных групп боковых цепей аминокислотных остатков, вносящих вклад в полосу амид II. Высокочастотное смещение максимума полосы амид II так же, как амид I, вызвано изменениями частоты деформационного колебания NH-групп (1542 см^{-1}) полипептидного остова при инициированных МП конформационных изменениях макромолекул. Приведенные результаты показывают, что при экстракорпоральной аутогемамагнитотерапии, вероятно, не происходит существенных изменений взаимодействия поверхностных групп боковых цепей аминокислотных остатков, которыми определяется глобулярная упаковка макромолекул.

Новые ИК полосы поглощения крови, инициированные экстракорпоральной аутогемамагнитотерапией. Наряду с высокочастотным сдвигом и перераспределением интенсивности в компонентах полос амид I, амид III, амид V в спектрах некоторых образцов крови, подвергавшейся воздействию МП, наблюдаются новые полосы поглощения в областях 1000—1150 и 400—900 см^{-1} (рис. 2). Так, в области 1000—1150 см^{-1} появляются полосы при 1018, 1038 см^{-1} , усиливается поглощение в области полосы с $\nu_{\text{макс}} = 1105 \text{ см}^{-1}$, образованной несколькими перекрывающимися полосами: 1053, 1084, 1105 и 1121 см^{-1} . Возникновение новых полос может отображать как увеличение концентрации некоторых компонентов крови в результате инициированных МП вторичных реакций, так и изменения конформационного состояния аминокислотных остатков. В этой области проявляются колебания нуклеиновых кислот, в частности, асимметричное (1236 см^{-1}) и симметричное (1082 см^{-1}) колебания фосфатных групп PO_2^- . Увеличение интенсивности полос при 1084, 1053 см^{-1} может инициироваться влиянием МП на сахарофосфатный остов нуклеиновых кислот. В литературе имеются сведения об усилении обмена нуклеиновых кислот, активации



процессов метаболизма углеводов и липидов, стимуляции процессов гликолиза при воздействии МП [5]. Усиление поглощения в отдельных участках низкочастотной области (400—900 см^{-1}), как показано выше, вызвано возросшим вкладом α -геликальной конформации.

Рис. 2. ИК поглощение крови в области 1000—1200 см^{-1} до (1) и после экстракорпоральной аутогемамагнитотерапии (2); разрешенные при деконволюции компоненты полосы амид III после экстракорпоральной аутогемамагнитотерапии (3)

О механизмах действия МП. Согласно современным представлениям, влияние МП на кровь может происходить несколькими путями, реализующимися одновременно [3, 13, 14]. Однако конкретные физические модели, позволяющие анализировать и оценивать влияние МП на кровь на молекулярном уровне, в настоящее время не существуют. Первичные механизмы действия МП на биосистемы также неизвестны [3]. Из разнообразных механизмов магнитобиологических эффектов, обсуждавшихся в литературе, для анализа наблюдаемых спектральных изменений наибольший интерес представляет возможное изменение внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий белковых молекул крови: водородных и ион-

ных связей, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Так как совокупность этих взаимодействий обеспечивает сохранение пространственной структуры макромолекул, ее изменения в электромагнитных полях несомненно должны приводить к конформационным трансформациям белковых макромолекул, при которых атомные группы, перемещаясь в пространстве, поворачиваются вокруг слабых связей с разрывом одних и образованием других. Существуют литературные данные о влиянии конформации биомолекул на кинетику биопроцессов, на метаболические реакции и физиологические процессы в организме [14, 15]. Имеются сведения, что деление клеток, инициированное биохимическим сигналом, приводит к усилению ИК поглощения нуклеиновых кислот [16].

Приведенными в настоящей работе спектральными данными подтверждаются ранее отмеченные в [17] изменения в МП системы водородных связей, которые играют важную роль в сохранении пространственной структуры белков, и объясняется сдвиг ИК полос поглощения валентных и деформационных колебаний NH- и CO-связей. Анализ изменений положения и относительных интенсивностей ИК полос, выполненный в настоящей работе в областях поглощения амид I, амид III, амид IV, амид V, подтверждает наличие конформационных изменений в макромолекулах крови. Эти изменения могут рассматриваться в качестве одного из первичных механизмов действия низкочастотного МП на кровь *in vivo*. Известно, что конформационные изменения влияют на сродство макромолекул к лигандам, метаболитам, лекарственным препаратам. К настоящему времени детально исследовано влияние конформационных переходов на физико-химические и функциональные свойства важнейшего компонента крови — гемоглобина [18]. Интересные исследования, подтверждающие влияние конформации макромолекул на способность связываться с различными лигандами, метаболитами и лекарственными препаратами, выполнены в [19, 20] для такого важного транспортного белка, как альбумин здоровых и больных пациентов.

Выводы. Показано, что к числу наиболее характерных изменений ИК спектров крови при экстракорпоральной аутогемомангнитотерапии относятся высокочастотный сдвиг полос NH-валентных (амид A) и деформационных колебаний (амид II), CO-валентных колебаний (амид I), а также увеличение интенсивности α -геликальной компоненты полосы амид I.

Установлено, что экстракорпоральная аутогемомангнитотерапия может приводить также к изменениям положения и интенсивности ИК полос крови в области поглощения полос амид III, амид IV, амид V. Анализ этих изменений позволяет сделать вывод, что воздействие магнитного поля на кровь влияет на вторичную структуру глобулярных белков, увеличивая число геликальных сегментов за счет уменьшения числа пептидных групп, формирующих водородные связи. В то же время не отмечено существенных изменений третичной структуры, а следовательно, глобулярной упаковки макромолекул, которая определяется взаимодействием поверхностных групп аминокислотных остатков.

Изменения, вызванные экстракорпоральной аутогемомангнитотерапией, в ИК спектрах крови отличались для образцов, взятых у разных пациентов, что может быть связано с различиями в физиологическом состоянии организма пациентов, а также с разной продолжительностью эффекта последствия.

- [1] Ю.Н.Чиргадзе. В кн. “Итоги науки и техники. Молекулярная биология”, Москва, ВИНТИ, **1** (1973) 9—60
- [2] E.Vass, M.Holloosi, F.Besson, R.Buchet. Chem. Rev., **103** (2003) 1917—1954
- [3] В.Н.Бинге, А.В.Савин. УФН, **173**, № 3 (2003) 265—300
- [4] В.С.Улащик. Введение в теоретические основы физической терапии, Минск, Наука и техника (1981)
- [5] А.М.Демецкий, В.Н.Чернов, Л.И. Попов. Введение в медицинскую магнитологию, Ростов-на-Дону, изд-во Рост. ун-та (1991)
- [6] D.M.Byler, H.Susi. Biopolymers, **25** (1986) 469—487
- [7] H.Fabian and W.Mantele. In “Handbook of Vibrational Spectroscopy”, Ed. J.M.Chalmers and P.R.Griffiths, Chichester, J.Wiley and Sons Ltd (2002) 1—26
- [8] Х.Д.Якубке, Х.Ешкайт. Аминокислоты, пептиды, белки, Москва, Мир (1985)
- [9] Yu.N.Chirgadze and E.V.Brazhnikov. Biopolymers, **13** (1974) 1701—1712
- [10] S.Yu.Venyaminov and N.N.Kalnin. Biopolymers, **30** (1990) 1243—1257
- [11] S.Cai, B.R.Singh. Biophys. Chem., **80** (1999) 7—20
- [12] Ю.Н.Чиргадзе, А.М.Овсепян. Докл. АН СССР, **201** (1971) 744—746
- [13] Р.П.Кикут. Реакция биологических систем на магнитные поля, Москва, Наука (1978) 150—166
- [14] В.Н.Аносов, Э.М.Трухан. Докл. РАН. Сер. биохим., биофиз., **392** (2005) 689—692
- [15] Л.И.Иржак, В.В.Гладилов, Н.А.Мойсеенко. Дыхательная функция крови в условиях гипероксии, Москва, Медицина (1985)
- [16] T.I.Karu. In “Biomedical Photonics Handbook,” Ed. T.Vo-Dinh, Boca Raton, FL, CRS Press LLC (2003) 48-1—48-2
- [17] Г.А.Залесская, Н.П.Митьковская, О.А.Галай, А.В.Кучинский. О.В.Ласкина. Журн. прикл. спектр., **74** (2007) 199—204
- [18] M.F.Perutz, J.E.Ladner, S.R.Simon, C.No. Biochemistry, **13** (1974) 2163—2173
- [19] Г.В.Троицкий. Молек. биология, № 33 (1982) 3—11
- [20] A.I.Ivanov, E. A.Korolenko, E.V.Korolik, S.P.Firsov, R.G.Zhbankov, M.K.Marchewka, H.Ratajczak. Archiv. Biochem. Biophys., **408** (2002) 69—77