

## **ВЛИЯНИЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДИАПАЗОНОВ НА КОНФОРМАЦИЮ МОЛЕКУЛ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА**

В работе исследовалось действие на белок (бычий сывороточный альбумин) терагерцового лазерного излучения на частотах 1,15 ТГц и 3,68 ТГц при мощности излучения около 10 милливатт. Методом УФ спектрофотометрии установлено увеличение оптической плотности облученных образцов бычьего сывороточного альбумина на характеристических полосах поглощения, свидетельствующее о конформационных изменениях в белковых молекулах.

*Ключевые слова:* бычий сывороточный альбумин, терагерцовое лазерное излучение, УФ-спектрофотометрия, конформационные изменения.

**A. V. Kapralova, A.S. Pogodin**

## **INFLUENCE OF TERAHERTZ RADIATION OF VARIOUS RANGES ON MOLECULE CONFORMATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN**

We investigated the influence of THz laser radiation of frequencies of 1.15 THz and 3.68 THz and radiation power of about 10 Mw on protein (bovine serum albumin). Using UV spectrophotometry, we revealed increase in the optical density of irradiated samples of bovine serum albumin at the characteristic absorption bands, which is evidence of conformation changes in protein molecules.

*Keywords:* bovine serum albumin, terahertz laser radiation, UV spectrophotometry, conformation changes.

### **Введение**

Для биофизики особый интерес представляют исследования влияния терагерцового излучения на биологические объекты. К настоящему времени уже установлено, что терагерцовое излучение определённым образом воздействует на различные биообъекты [1, 2]. Еще ранее были обнаружены различные эффекты воздействия миллиметрового излучения на биообъекты разного уровня сложности [3]. В этих работах так или иначе предполагается «нетепловой» механизм действия излучения низкой интенсивности, которую обычно ограничивают максимальным значением 0,1–1,0 Вт/см<sup>2</sup>. Однако ни общих, ни конкретных физических механизмов действия низкоэнергетических и низкоинтенсивных лазерных излу-

чений ТГц диапазона на биологические объекты пока не предложено.

Логично предположить, что основы физических механизмов всех эффектов действия электромагнитного излучения, в том числе лазерного излучения, на биологические объекты лежат на молекулярном уровне [4]. И самого пристального внимания с этих позиций требуют к себе важнейшие биополимеры – нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) и белки.

Настоящая работа является экспериментальным исследованием влияния терагерцового лазерного излучения на конформационные переходы в молекулах биополимеров на примере белка бычьего сывороточного альбумина (БСА). Это основной транспортный белок сыворотки крови, имеющий сложную глобулярную структуру. БСА яв-

ляется удобной моделью для биофизических исследований в связи с его хорошей изученностью [5].

Молекула БСА представляет собой одну полипептидную цепь из 607 аминокислотных остатков, сложенную в виде ряда петель, организованных в три гибко связанных домена, каждый из которых состоит из трёх субдоменов. Аминокислотные петли могут смещаться относительно друг друга, что обеспечивает молекуле белка конформационную подвижность [6].

Спектр УФ поглощения альбумина характеризуется двумя полосами. Первая – интенсивная полоса в области 200–220 нм, обусловлена наличием большого числа амидных групп в составе пептидных связей (– CONH –). Вторая – менее интенсивная

полоса в районе 280 нм обусловлена наличием в структуре белка таких сильных хромофоров, как аминокислотные остатки триптофана и тирозина. Поскольку на полосе 280 нм поглощение этих хромофоров практически ничем не маскируется, она считается наиболее чувствительной к изменениям конформации альбумина [4; 5; 6].

### Материалы и методы

Источником терагерцового излучения служил перестраиваемый аммиачный субмиллиметровый лазер с оптической накачкой, генерирующий непрерывное излучение на частотах: 1,15 ТГц (261 мкм) и 3,68 ТГц (81,5 мкм). Параметры лазерного излучения приведены в таблице:

Параметр излучения	СММ-лазер	
Длина волны	81,5 мкм	261 мкм
Частота излучения	3,68 ТГц	1,15 ТГц
Мощность излучения	10 мВт	10 мВт

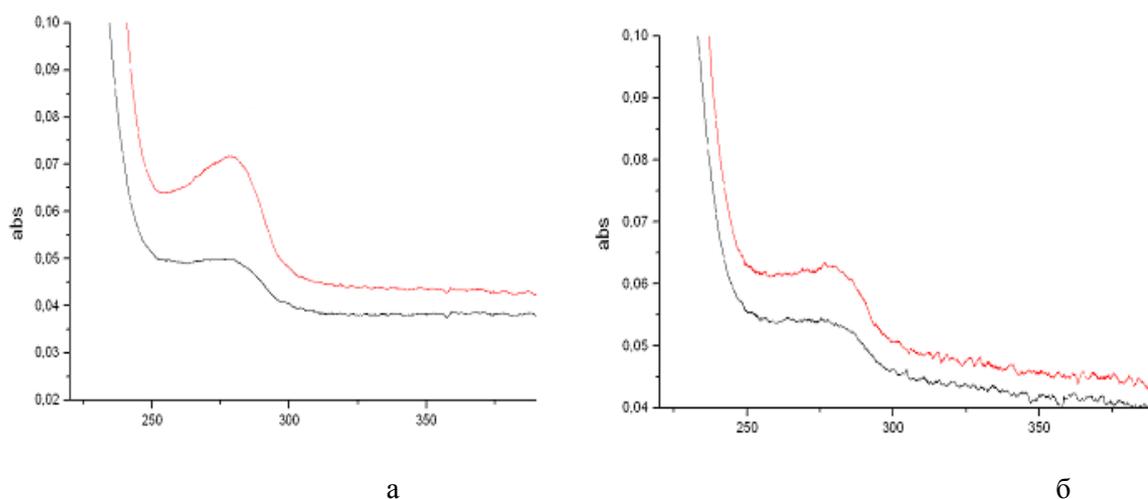
Для проведения экспериментов использовался бычий сывороточный альбумин «БСА Sigma» (лиофилизированный порошок). Эксперименты проводились с пленочными препаратами бычьего сывороточного альбумина. Для приготовления водного раствора белка брали приблизительно 1 мг порошка БСА и помещали в плотно закрывающуюся пластиковую пробирку. Навеску растворяли бидистиллированной водой до концентрации белка 1 мг/мл и тщательно перемешивали встряхиванием до полного растворения сухого остатка. Белковые пленки готовились следующим образом. На тщательно очищенную подложку, в качестве которой использовалась тонкая пластинка из кристаллического кварца, с помощью автоматического микродозатора (микропипетки) наносили аликвоту раствора БСА объемом 50 мкл и затем покровным стеклышком равномерно распределяли нанесенную каплю по поверхности подложки. Полученную белковую пленку высушивали при комнатной температуре в течение 25–30 мин. Тол-

щина подготовленных таким образом пленочных препаратов составляла 1–3 мкм, о чем, как и о геодезическом рельефе пленочной поверхности, выборочно судили по результатам эллипсометрии. В центральной части пленки толщина колеблется в пределах  $\pm 10\%$ .

Оценка действия терагерцового лазерного излучения на молекулы БСА проводилась с помощью УФ спектроскопии как наиболее распространенного и информативного метода исследования конформационных перестроек в белках. Для регистрации спектров использовался двулучевой УФ спектрометр SHIMADZU UV-3101PC и прилагаемый к нему пакет обрабатывающих программ.

### Результаты и их обсуждение

На рисунке приведены характерные изменения оптической плотности пленок БСА в УФ диапазоне 200–300 нм после облучения их субмиллиметровым лазером на частотах 1,15 и 3,68 ТГц.



УФ-спектры (оптическая плотность) пленок БСА до (контроль) и после лазерного облучения: *a* – частота излучения 3,68 ТГц, длина волны 81,5 мкм; *б* – частота излучения 1,15 ТГц, длина волны 261,0 мкм. Время облучения 60 минут. Чёрная линия – спектр пленки БСА до облучения (контроль). Красная линия – спектр той же пленки БСА после облучения

Как уже отмечалось выше, поглощение УФ альбумином в области 200–230 нм обусловлено, главным образом, наличием сопряженных  $\pi$  – связей, как в линейных структурах, так и ароматических кольцах аминокислот триптофана и тирозина. Увеличение абсорбции УФ излучения на первой (200–220 нм) и, особенно, второй (280 нм) характеристических белковых полосах после облучения БСА свидетельствует о таких структурных изменениях белковой молекулы под влиянием лазерного облучения, которые «открывают» доступ УФ лучей к триптофану и тирозину. Это указывает на снижение плотности белковой глобулы или определенных ее частей, т. е. общее или локальное увеличение эффективной площади молекулярной поверхности (или т.н. сечения поглощения отдельной молекулы в терминах биофизики). Это предположение хорошо согласуется с данными по количественным оценкам объема и площади поверхности молекул альбумина при изменении их конформации [5]. Можно также заключить, что при действии на белок ТГц излучения с указанными выше характеристиками каких-либо значимых деструктивных нарушений молекулярной структуры БСА не происходит, поскольку, как показано в работе [1], функциональная способность БСА после лазерного облучения не

утрачивается. Субстратсвязывающая способность БСА в отношении стероидного гормона – прогестерона оценивалась в этой работе по интенсивности тушения флуоресценции. Сопоставление этих данных свидетельствует также и о модифицирующем влиянии ТГц излучения на функциональную способность БСА.

В результате серии проведенных экспериментов было установлено следующее.

1. Пленочные препараты альбумина являются удобными объектами для исследования действия ТГц излучения на белки.

2. Терагерцовое лазерное излучение с частотами 1,15 и 3,68 ТГц вызывает сходные по характеру спектральные изменения облученных пленочных препаратов БСА, выражающиеся в увеличении оптической плотности образцов на характеристических для белка полосах поглощения.

3. Сопоставление наших результатов с данными, полученными на основе флуориметрических измерений по оценке субстратсвязывающей способности БСА, свидетельствуют о конформационных изменениях молекул белка под воздействием лазерного терагерцового излучения, вызывающих модификацию, но не нарушение транспортной функции сывороточного альбумина. Это обстоятельство указывает на отсутствие каких-либо деструктивных изменений в белке

при действии терагерцового излучения, характеризуемого приведенными выше параметрами.

4. В целом, результаты представленной работы свидетельствуют о несомненном влиянии низкоинтенсивного терагерцового лазерного излучения на конформацию белковых молекул, не приводящем к нарушению структуры и функции белка, и, по-видимому, не обусловленном прямым тепловым воздействием излучения лазера на альбумин.

#### **Список литературы**

1. Черкасова О. П., Федоров В. И., Немова Е. Ф., Погодин А. С. Влияние лазерного терагерцового излучения на спектральные характеристики и функциональные свойства альбумина // *Оптика и спектроскопия*. Т. 107. № 4. 2009.

2. Фёдоров В. И., Погодин А. С., Дубатолова Т. Д., Варламов А. В., Леонтьев К. В., Хамоян А. Г. Сравнительное исследование

влияния электромагнитного излучения инфракрасного, субмиллиметрового и миллиметрового диапазонов на индуцированные гамма-облучением соматические мутации клеток крыльев *Drosophila melanogaster* // *Биофизика*. Т. 46, В. 2, 2001.

3. Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь», 1991.

4. Рубин А. Б. *Биофизика*. М.: Книжный дом «Университет», 1999. Т. 1–2.

5. Грызунов Ю. А. Методы исследования альбумина и его связывающей способности // *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине*. М.: Ириус, 1994.

6. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия*. М. Мир. 1984. Т. 2.