

WPLYW PROMIENIOWANIA UV NA AKTYWNOŚĆ HEMOPROTEIDÓW
W MODELOWYM ZKŁADZIE LUMINOL - H₂O₂ - OH⁻*

Janusz Sławiński, Stanisław Wnuk

Instytut Chemii i Fizyki, Akademia Rolnicza,
60-625 Poznań, ul. Wojska Polskiego 75

Fotoutlenianie biopolimerów indukowane promieniowaniem UV w obecności rozpuszczonego O₂ jest ostatnio przedmiotem licznych badań ze względu na poznawcze i praktyczne znaczenie tego procesu [1, 4, 6]. Nawet nieznaczne zmiany symetrii pola ligandów lub własności chemicznych fotoutleniających reszt aminokwasów aromatycznych i siarkowych enzymów hemowych powodują drastyczne zmiany aktywności enzymatycznej [1, 2]. Wiadomo, że zdolność hemoproteidów do aktywowania chemiluminescencji (CL) układu: luminol (hydrazyd kwasu 5-amino-ftalowego) - H₂O₂-OH⁻ zależy silnie od stanu konformacyjnego i fizykochemicznego [8, 9]. Układ: hemoproteid - luminol - H₂O₂-OH⁻, emitujący silną CL, stanowić więc może wygodny model dla badania wpływu promieniowania UV na aktywność hemoproteidów. Stosując taki układ, autorzy stwierdzili wzrost aktywności cytochromu c dla małych dawek UV [7]. Niniejszy komunikat stanowi kontynuację i uzupełnienie poprzednich badań.

MATERIAŁ I METODY

Cytochrom c z serc wieprzowych (Biomed, Kraków) o zawartości 90-100% czystej substancji rozpuszczono w uprzednio napromienionym 10 mM buforze NaCO₃-NaHCO₃, pH 10. Dla celów porównawczych stosowano również 10 μM roztwory hematyny (Merck) i hemoglobiny krwi ludzkiej (Biomed). Roztwory związku hemowego o stężeniu 10 μM naświetlano zanurzeniową lampą rtęciową TQ-81 (Hanau) o całko-

*Pracę realizowano w temacie MNSzWiT R.III.13.1.2

witym natężeniu emisji λ od 250-450 nm $10^{19} \text{ h}\nu \cdot \text{dcm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ w temperaturze 34-36°C w układzie przepływowym. Po różnym czasie naświetlania (τ_{ir}) mierzono widma chemiluminescencji, fluorescencji i absorpcji roztworów. Próbki roztworów naświetlonych i nienaświetlonych (kontrolnych) użyto dla aktywowania CL w modelowym układzie: luminol - H_2O_2 - OH^- . Początkowe stężenia substratów w tym układzie, wymienione wg kolejności mieszania, były następujące: 2 mM H_2O_2 , 20 mM bufor fosforanowy pH 8.0, 1 μM luminol, 1 μM związek hemowy i woda bidestylowana do ogólnej objętości 5 cm^3 . Roztwory substratów wstrzykiwano do kuwety umieszczonej przed fotokatodą fotopowielacza FEU-18 A. Sygnał rejestrowano za pomocą rejestratora K-201 Zeissa. Każdy pomiar powtarzano 5-8 razy, a wyniki opracowano statystycznie [5]. Przyrząd wykalibrowano w jednostkach absolutnych, używając standardu chemiluminescencyjnego [3]. Absolutne wartości natężenia świecenia, I_a , oraz integralnego natężenia, $\sum I_a$, sumy świetlnej obliczono z zależności:

$$I_a = \frac{d\sum I_a}{dt} \text{ oraz } \sum I_a = \eta \int_{t=0}^{t=\infty} I(t) dt,$$

gdzie I - względne natężenie świecenia zapisane przez rejestrator, a $\eta = \frac{(N_{h\nu})_s}{\sum I_s} \cdot \sum I_s$ jest względnym integralnym natężeniem świecenia, równym powierzchni pod krzywą kinetyczną świecenia $I=f(t)$, a $(N_{h\nu})_s$ jest absolutną liczbą fotonów emitowanych w standardowej reakcji. Liniowy przebieg funkcji $I_s = f([L])$, uzyskany dla $[L] = 10^{-8}$ - 10^{-5} M (L - stężenie luminolu w standardzie) wykazał, że aparatura fotoelektryczna daje liniową zależność między sygnałem $I, \sum I$, a absolutną liczbą kwantów $h\nu$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wartości najważniejszych parametrów, charakteryzujących natężenie maksymalne I_{\max} , $\sum I(t)$ oraz kinetykę CL: czas osiągnięcia maksimum natężenia t_{\max} i czas połowiczny zaniku świecenia $t_{1/2}$ zestawione dla różnych wartości τ_{ir} w tabeli 1. Wzrastające dawki promieniowania wywierają różny wpływ na cyt c oraz na hematyne

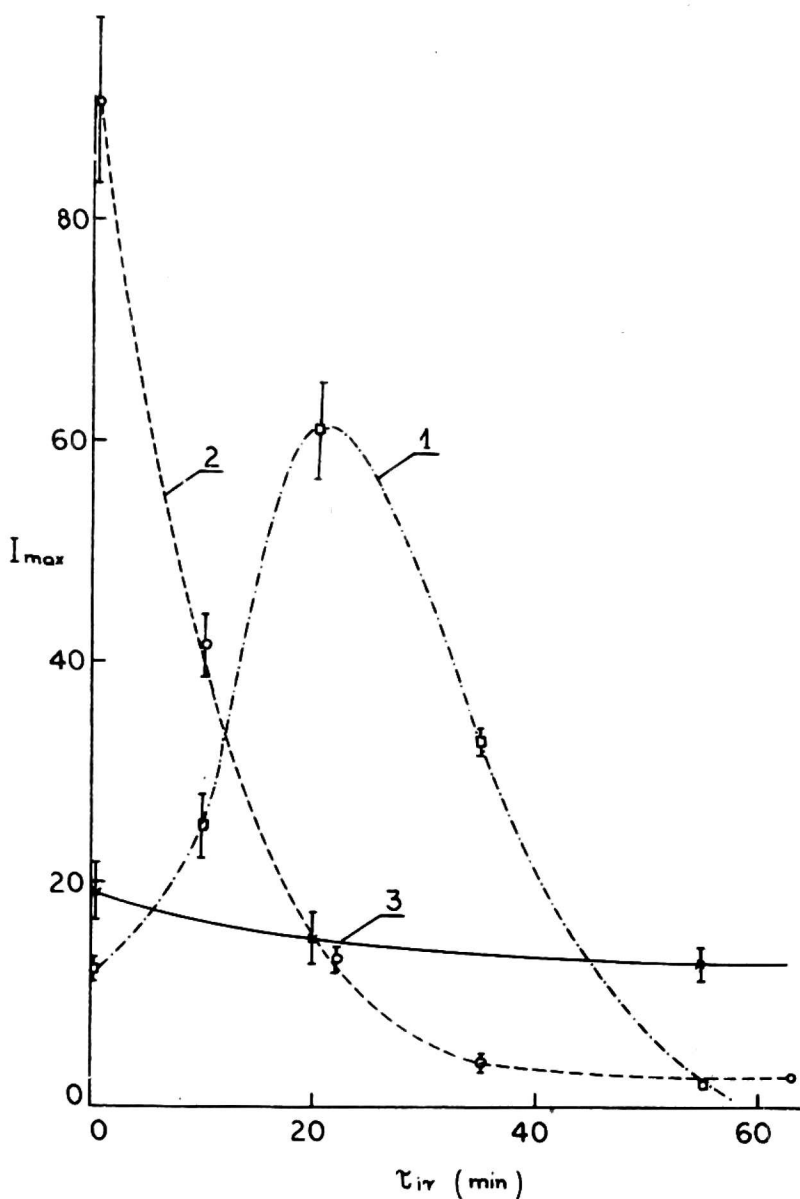
T a b e l a 1

Wpływ naświetlania UV na zdolność związków hemowych aktywowania chemiluminescencji modelowego układu luminol - H_2O_2 - OH^-

Związek	Czas naświetla- nie τ ir min	I_{max}	$\sum I(t)_{10 \text{ min}}$	τ_{max} (sek)	$\tau_{1/2}$ (sek)
cyt c*	0	12 ± 2	101 ± 7	7 ± 1	99 ± 15
	10	25 ± 6	172 ± 17	10 ± 1,5	54 ± 8
	20	61 ± 9	338 ± 13	20 ± 5	79 ± 7
	35	33 ± 2	162 ± 6	9 ± 2	53 ± 8
	55	2 ± 0,2	9 ± 0,2	6 ± 1	37 ± 4
Hb	0	19 ± 5	113 ± 20	120 ± 7	427 ± 30
	20	15 ± 4	91 ± 14	86 ± 11	328 ± 87
	55	13 ± 3	59 ± 5	30 ± 6	212 ± 53
	75	4 ± 2	23 ± 9	23 ± 8	295 ± 49
	120	0,6 ± 0,5	3 ± 2	10 ± 6	340 ± 125
Hematyna	0	173 ± 15	333 ± 8	7 ± 1	26 ± 3
	10	83 ± 6	247 ± 3	10 ± 1	40 ± 4
	22	26 ± 1,5	115 ± 1	12 ± 0,2	59 ± 6
	35	7 ± 0,7	53 ± 1	20 ± 0,2	102 ± 10
	63	3 ± 0,2	26 ± 2	15 ± 2	128 ± 13

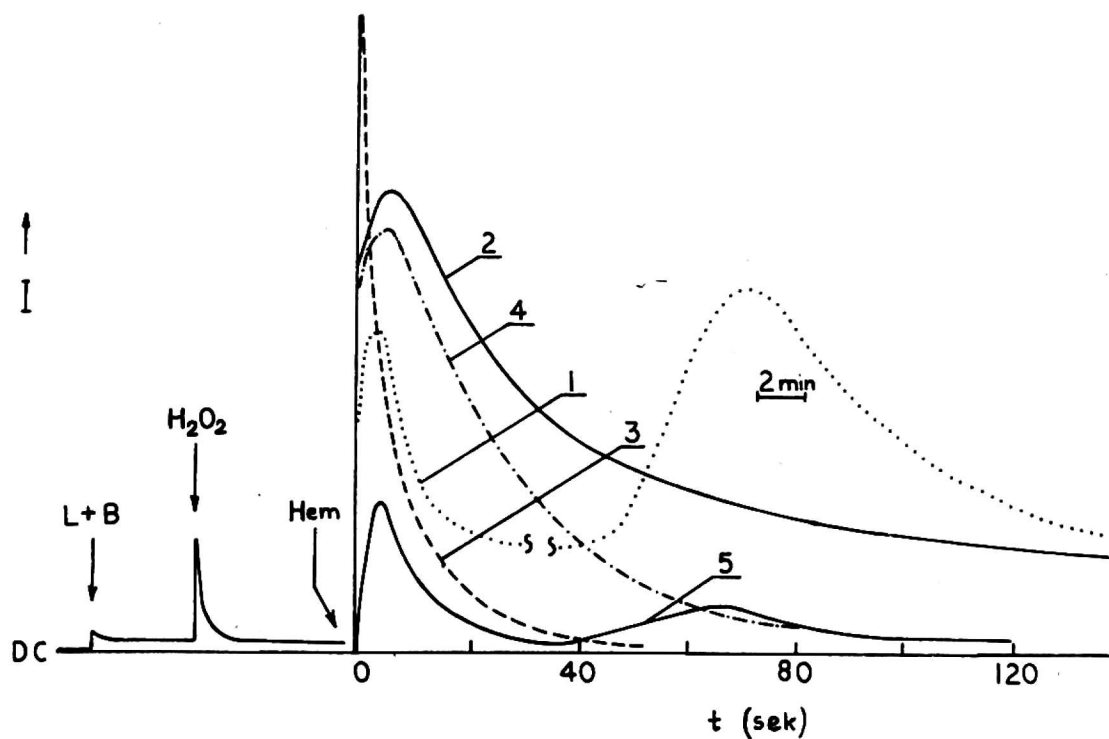
*Dla cyt c podane są wartości $\sum I(t)_{5 \text{ min}}$.

i hemoglobulinę. Chemiluminescencyjna aktywność cyt c, wyrażona jako I_{\max} i $\sum I(t)$ układu luminol - $H_2O_2-OH^-$, wzrasta w zakresie dawek $5 \cdot 10^{18} - 3 \cdot 10^{19}$ fotonów $\cdot cm^{-3}$ całkowitego promieniowania, emitowanego przez lampę TQ-81. Aktywność hematyny i hemoglobiny monotonicznie maleje natomiast wraz ze wzrostem dawki promieniowania (rys. 1). Szybkość generowania wzbudzonych cząsteczek kwasu 3-aminofталowego w układzie: luminol - $H_2O_2-OH^-$ [3], która jest odwrotnie proporcjonalna do t_{\max} , maleje dla cyt c i hematyny, natomiast wyraźnie wzrasta dla hemoglobiny. Czas połowkowy $t_{1/2}$



Rys. 1. Wpływ czasu naświetlania na maksymalne natężenie świecenia układu: luminol - $H_2O_2-OH^-$, aktywowanego kontrolnym i naświetlanym związkiem hemowym; 1 - cyt c, 2 - hematyna, 3 - hemoglobina. Stężenia reagentów: 1, 2, 3 i luminol - $1 \mu M$, H_2O_2 - $2 mM$, bufor fosforanowy pH 8.0, $20 mM$, temperatura $20-22^\circ C$

zwiększa się dla hematyny, a zmniejsza dla cyt c ze wzrostem τ_{ir} aż do 63 min. Kinetyka świecenia, tj. przebieg funkcji $I = f(t)$ jest różna dla cyt c natywnego i naświetlonego, natomiast w przypadku hematyny i hemoglobiny różnice między krzywymi $I = f(t)$ dla roztworów kontrolnych i naświetlonych są znacznie mniejsze i dotyczą tylko wartości parametrów I_{max} , t_{max} i $t_{1/2}$ (rys. 2). Na rysunku 2 widać 2 maksima świecenia układu: luminol - $H_2O_2-OH^-$ dla natywnego (kontrolnego) cytochromu c. Drugie maksimum pojawia się po czasie 1300 ± 100 s, a czas połówkowy zaniku świecenia wynosi około 900 sekund. Taki przebieg kinetyki świecenia ma miejsce, gdy do układu cytochrom c lub hematyna + luminol + $H_2O_2+OH^-$ wprowadzi się inhibitory reakcji rodnikowych o niskim potencjale oksydoredukcyjnym, np. 1 μM roztwory kwasu askorbinowego lub hydrochinonu. Wtórne maksimum zaobserwował również Weber i współpr. [10] dla CL luminolu aktywowanej krwią różnych ssaków.



Rys. 2. Krzywe kinetyczne chemiluminescencji różnych kombinacji składników badanych układów: 1 - cyt c natywny ($\tau_{ir} = 0$), 2 - cyt c naświetlany 10 min ($I \times 0,25$), 3 - hematyna naświetlana 10 min ($I \times 0,25$), 4 - hemoglobina $\tau_{ir} = 20$ min, 5 - cyt c + H_2O_2 + bufor (bez luminolu); warunki i stężenia jak na rys. 1

Różnice między kształtem funkcji $I_{max} = f(\tau_{ir})$ dla cytochromu c i heminy (rys. 2) próbowano przypisać wpływowi komponenty białkowej na aktywność katalityczną hemu [7]. Z wyników przedstawionych w tej pracy okazuje się jednak, że naświetlana hemoglobina

zachowuje się podobnie jak hematyna, która nie zawiera komponenty białkowej. Warto dodać, że cytochrom c ogrzewany 1 godzinę w 80-90°C, chociaż nie ulega denaturacji, wzmacnia I_{\max} o około 30%. Wstępne doświadczenia z cytochromu c degradowanym chemicznie (na drodze „ciemnej” za pomocą $H_2O_2 + OH^-$, pH 8,0) wskazują na istnienie silnego efektu synergicznego: cyt c natywny + cyt c degradowany daje I_{\max} CL luminolu ponad 500% wyższe od CL aktywowanej natywnym cyt c [11]. Badania zmierzające do wyjaśnienia przyczyn obserwowanych efektów są kontynuowane.

LITERATURA

1. Folin M., Gennari G., Jori G.: Photochem. Photobiol. 20, 357-370, 1974
2. Kalabuhova T. N., Kondakova N. W., Eidus L. N.: Biofizika, 13 741-744, 1973
3. Lee J., Seliger H. H.: Photochem. Photobiol. 11, 247-258, 1970
4. Rabek J. F., Ranby B.: Photochem. Photobiol., 28, 557-570, 1978
5. Rokosz A.: Wiad. Chem. 12, 635-642, 1956
6. Sławiński J., Sławińska D., Puzyna W.: Photochem. Photobiol. 28, 75-81, 28, 459-463, 1978
7. Sławiński J., Wnuk S.: Polish J. Chem. zgłoszone do druku, 1980
8. Syrzysko I.: Polish-German Symp. on Bioenergetics and ATP-Dependent Proteins, Uniejów, Univ. Łódź, abstr. 13, 44-49, 1974
9. Weber K.: Archiv za Kemiju, 23, 173-183, 1951
10. Weber K., Drpić-Majić D., Svetličić B.: Archiv. Exper. Veterinärmedizin, 23, 935-943, 1969
11. Żywucki B., Małak H., Sławiński J.: w przygotowaniu do druku, 1979

Я. Славински, С. Внук

ВЛИЯНИЕ УФОБЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ГЕМОПРОТЕИНОВ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ - ЛЮМИНОЛ - H_2O_2 - OH^-

Резюме

Водные растворы гемопро~~теи~~нов (1 μ М, pH 10,303⁰К) облучали светом УФ лампы ТQ-81 ($\lambda = 250-430$ nm, $I = 10^{19}$ $h\nu / dcm^3 \cdot s$). Растворы облучались разное время (τ_{ir}), после чего эти и контрольные растворы вводили в систему люминол - H_2O_2 - OH^- (pH 8,0) с целью

активирования сильной хемилюминесценции (хл). Для дозы облучения $5 \cdot 10^{18} - 3 \cdot 10^{19} \text{ h}\nu / \text{cm}^3$ наблюдалось повышение активности цитохрома с в 3-5 раза относительно контроля. Облучение гематина и гемоглобина всегда приводило к уменьшению их хемилюминесцентной активности. Кинетические параметры хл чётко изменялись после облучения.

J. Sławiński, S. Wnuk

THE INFLUENCE OF UV-RADIATION ON THE ACTIVITY OF
HEMOPROTEINS IN THE MODEL SYSTEM LUMINOL - H_2O_2 - OH^-

S u m m a r y

The effect of irradiation with a TQ-81 Hg-lamp ($\lambda = 250-450 \text{ nm}$, $I = 10^{19} \text{ h}\nu \cdot \text{dcm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) on the ability of cytochrome c, hematin and hemoglobin to activate chemiluminescence of the luminol - H_2O_2 - OH^- system was studied. For the exposure doses $5 \cdot 10^{18} - 3 \cdot 10^{19} \text{ h}\nu \cdot \text{cm}^{-3}$, the activity of irradiated cyt c increased in comparison to that of the native cyt c by factor 3-5, while that of hematin and hemoglobin only decreased. Dramatic changes in kinetics of chemiluminescence, caused by the irradiation were also observed.