

*Piotr Duchnowicz, Wirgiliusz Duda*

## **BADANIE ODDZIAŁYWANIA PRODUKTÓW DEGRADACJI PARAQUATU I GRAMOXONU Z HEMOGLOBINĄ CZŁOWIEKA I RYBY**

W pracy przedstawiono badania wpływu Paraquatu (PQ), Gramoxonu (GX) na wodne roztwory hemoglobiny karpia i człowieka. Do izolowania produktów degradacji PQ z Gx zastosowano chromatografię cienkowarstwową na płytkach z Silica żelalem. Czystość otrzymanych frakcji sprawdzono za pomocą rechromatografii. Otrzymane frakcje zidentyfikowano za pomocą pomiarów widm absorbcyjnych w podczerwieni, w zakresie UV i światła widzialnego. Stopień wiązania produktów degradacji PQ do hemoglobiny określono metodą sączenia molekularnego na złożu Sephadex G-50. Wpływ frakcji Gx na hemoglobinę badano metodą spektrofotometryczną, rejestrując widma w zakresie  $\lambda = 200\text{--}900\text{ nm}$ , w czasie od 0 do 3 h co 30 min. Badano wpływ pH środowiska na stopień wiązania PQ, Gx i frakcji Gx z hemoglobiną. W pracy wykazano, że hemoglobina ma istotne znaczenie w transporcie PQ i jego produktów degradacji oraz, że hemoglobina karpia silniej wiąże badane ligandy niż hemoglobina człowieka.

### **1. WPROWADZENIE**

Postępująca chemizacja rolnictwa i innych gałęzi gospodarki naraża rośliny, zwierzęta i ludzi na kontakt z substancjami toksycznymi. Wpływ tych substancji na organizmy żywe jest różny. Związki te możemy ogólnie podzielić na trzy bardzo szerokie kategorie:

1. związki onkogenne;
2. związki powodujące nieodwracalne zmiany w organizmie i w konsekwencji śmierć;
3. związki powodujące odwracalne zmiany w organizmie, co określamy jako chwilowe zatrucie organizmu.

Większość substancji toksycznych jest wchłaniana trzema drogami: poprzez skórę i błony śluzowe, poprzez układ pokarmowy oraz układ oddechowy. Po wnikięciu do organizmu związki toksyczne mogą zakłócać jego homeostazę lokalnie lub globalnie, albo też zakłócać pracę poszczególnych narządów. Przy globalnym zatruciu organizmu należy rozpatrzyć wpływ

związków toksycznych modyfikujących właściwości krwi, a szczególnie właściwości hemoglobiny jako białka przenoszącego tlen z płuc do tkanek.

Szczególnie groźne są związki toksyczne wchodzące w skład różnego rodzaju preparatów ochrony roślin ze względu na ich masowe stosowanie w rolnictwie i ogrodnictwie. Związki toksyczne są często trudno rozkładane przez bakterie glebowe i nie są metabolizowane przez rośliny i zwierzęta. Mogą one przenikać do wód gruntowych i zatruchiwać zwierzęta wodne (m. in. ryby) oraz zwierzęta lądowe. Mogą także kumulować się w organizmie zwierząt. Jednym z takich preparatów jest Gramoxon (25% lub 20% wodny roztwór Paraquatu), który jest herbicydem kontaktowym o działaniu nieselektywnym. Niszczy on zielone części roślin, poprzez generowanie wolnych rodników tlenowych w ilościach szkodliwych dla roślin.

Wysoki stopień zanieczyszczenia środowiska naturalnego, a szczególnie wód gruntowych, zmusza nas do podjęcia badań mających na celu dokładne zbadanie wpływu różnych substancji toksycznych (w tym Paraquatu) na organizm zwierząt oraz człowieka i do podjęcia kroków zapobiegawczych.

Dogodnym materiałem do badań są hemoglobiny jako hemowe białka oddechowe – przenośniki tlenu. Właściwości funkcjonalne Hb są uwarunkowane ich strukturą i każda zmiana tych właściwości poprzez ingerencje w budowę cząsteczki może być względnie łatwo zarejestrowana. Zmiany właściwości Hb pod wpływem związków toksycznych (np. PQ) mogą być wskaźnikiem zmian w środowisku zwierząt.

## 2. CEL PRACY

Ciągła chemizacja środowiska jest nieodwracalnym i nieuniknionym procesem towarzyszącym działalności człowieka. Mimo korzyści płynących z zastosowania środków chemicznych w rolnictwie (nawozy sztuczne, środki ochrony roślin) należy jednak ocenić, czy korzyści płynące z zastosowania nowego środka będą przeważały nad negatywnymi skutkami jego użycia. Ciągłe, mimo badania wpływu na organizmy żywe preparatów stosowanych w rolnictwie, do użycia wprowadzane są środki w niedostatecznym stopniu sprawdzone, które uważane za niegroźne, stają się po krótkim czasie stosowania przyczyną zatruć, a nawet śmierci.

Oceniając z perspektywy minionych lat masowe stosowanie Paraquatu (związek czynny herbicydu o nazwie Gramoxon) wydaje się, że nie zostało poprzedzone wszechstronnym i szczegółowym przebadaniem mechanizmu jego toksycznego działania na zwierzęta i ludzi. Dlatego też do tej pory, mimo zakazu produkcji czy używania Gramoxonu, w wielu krajach zdarzają się groźne wypadki zatrucia ludzi i zwierząt.

Studia nad toksycznym działaniem PQ ograniczają się na ogół do opisu skutków spowodowanych przez ten preparat. Ciągłe brakuje także uogólnionego mechanizmu jego działania na poziomie molekularnym. Taki stan rzeczy i fakt, że PQ gromadzony jest w tkankach wysoko ukrwionych – w płucach i skrzelach skłonił nas do podjęcia badań jego oddziaływania z hemoglobina człowieka i ryb.

Dogodnym materiałem do badań są HbA człowieka i Hb karpia jako dwie dobrze poznane w aspekcie funkcjonalnym i strukturalnym hemoglobiny kręgowców. Celem pracy było zbadanie wpływu produktów degradacji PQ na Hb. Aby rozwiązać tak postawiony problem podjęto następujące badania:

- 1) ustalono warunki izolowania i oczyszczania Hb człowieka i karpia oraz zbadano czystość otrzymanych składników,
- 2) ustalono warunki rozdziału GX na składniki oraz zbadano ich czystość,
- 3) ustalono warunki badań interakcji uzyskanych frakcji GX z hemoglobinami.

Zatem, w niniejszej pracy wykonano badania dotyczące:

- stopnia wiązania PQ, GX i frakcji GX do Hb,
- wpływu pH na stopień wiązania PQ, GX i frakcji GX do Hb,
- wpływu czasu i pH na zmiany w Hb w czasie inkubacji z PQ, GX i frakcjami GX.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### *Metody preparatywne*

Postępowanie prowadzące do otrzymania czystej Hb z masy erytrocytarnej pochodzącej ze Stacji Krwiodawstwa w Łodzi przedstawia schemat 1. Według schematu 2 przeprowadzono preparatykę krwi karpia otrzymanych z gospodarstwa rybnego [11].

#### *Metody analityczne*

##### **Oznaczanie stężenia Hb**

Stężenie Hb oznaczano metodą Drabkina [2] polegającą na przeprowadzeniu roztworu Hb w formę cyjanmet-Hb i pomiarze absorbancji w 540 nm. Stężenie Hb obliczano ze wzoru:

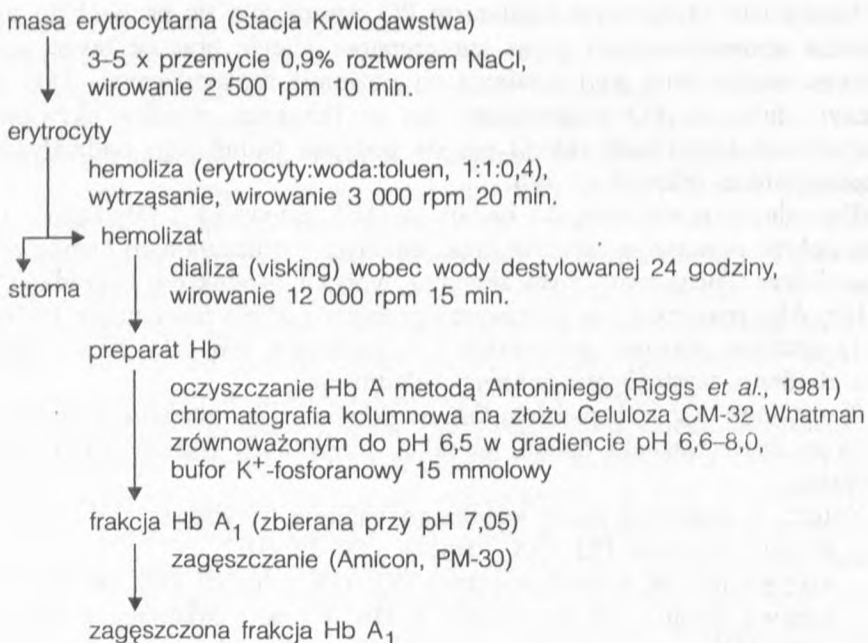
$$c \text{ [mM]} = 22.73 \times R \times A_{540}$$

22.73 – mmolowy współczynnik absorbancji dla tetramerycznej cząsteczki Hb;

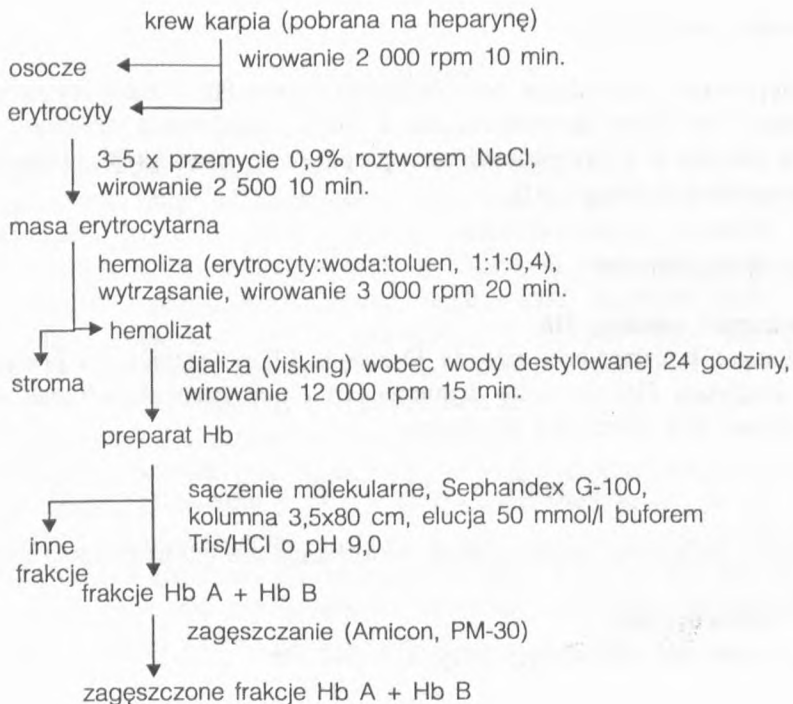
$R$  – rozcieńczenie;

$A_{540}$  – wartość absorbancji przy  $\lambda = 540 \text{ nm}$ .

### Schemat 1. Preparatyka hemoglobiny człowieka



### Schemat 2. Perparatyka hemoglobiny karpia



### Otrzymywanie utlenionej Hb (met-Hb)

Formę met-Hb otrzymywano dodając do roztworu Hb o znanym stężeniu około dwukrotny nadmiar żelazycjanku potasu. Nadmiar utleniacza usuwano za pomocą sączenia molekularnego na kolumnie ze złożem Sephadex G-25 (Pharmacia, Szwecja), elucja buforem  $K^+$ -fosforanowym o pH 7,00.

### Elektroforetyczny rozdział hemoglobiny w żelu poliakryloamidowym

Elektroforetyczny rozdział przeprowadzono w celu sprawdzenia czystości frakcji Hb po chromatografii kolumnowej korzystając ze zmodyfikowanej metody Davisa i Ornsteina [11]. Żele przygotowano stosując wodne roztwory wyjściowe (w 100 ml objętości) niżej podanych związków w proporcjach:

- 1) żel dzielący o pH 8,5:
  - 1 objętość 30 g akryloamidu (Serva, RFN), 0,8 g N,N'-metyleno-bis-akryloamidu (Fluka AG, Szwajcaria),
  - 1 objętość 18,15 g Tris (Serva, RFN) miareczkowany 1 mol/l HCl, 0,4 ml TEMED (Fluka AG, Szwajcaria),
  - 1 objętość 0,1 g nadsiarczanu amonu (POCH, Gliwice),
  - 1 objętość wody destylowanej;
- 2) żel zagęszczający o pH 7,2:
  - 1 objętość 5 g akryloamidu, 1,25 g N,N'-metyleno-bis-akryloamidu,
  - 1 objętość 2,28 g Tris, 12,8 ml 1 mol/l  $H_3PO_4$ , 0,1 ml TEMED,
  - 2 objętości 0,1 g nadsiarczanu amonu.

Stosowano bufor: katodowy Tris-glicyna o pH 8,5 i anodowy Tris-HCl o pH 8,1. Nanoszono próbki zawierające 10–100 mg białka w formie metHb. Jako marker stosowano błękit bromofenolowy. Natężenie prądu wynosiło 18–30 mA na próbkę.

Do wybarwiania frakcji białkowych używano roztworu o składzie 1,25 g Coomassie Blue R-250 (Fluka AG, Szwajcaria) w 250 ml metanolu, 250 ml wody destylowanej i 46 ml kwasu octowego. Czas barwienia wynosił 2 godziny w temperaturze pokojowej. Żel odbarwiano płynem płuczącym o składzie 10 ml kwasu octowego, 80 ml metanolu i 110 ml wody destylowanej.

### Otrzymywanie oczyszczonych frakcji Gramoxonu

Handlowy preparat GX (I.C.I., England przepakowywany na Węgrzech) poddano rozdzielowi metodą chromatografii cienkowarstwowej (Pre-Coated PLC Plates, silica gel 60, 20x20 cm, MERCK RFN). Płynem rozwijającym była mieszanina chloroform : metanol : 18% amoniak (1:2:1). Po rozwinięciu chromatogramu i zlokalizowaniu plam w świetle UV przystąpiono do elucji

frakcji za pomocą płynu rozwijającego. Po usunięciu złoża przez odwirowanie przystąpiono do usuwania rozwijacza (liofilizacja) w celu uzyskania suchych frakcji.

### **Identyfikacja uzyskanych frakcji GX**

W celu identyfikacji wykonano:

- widma UV i Vis frakcji po rozpuszczeniu w buforach  $K^+$ -fosforanowych o pH 6,0, 7,0 i 8,0;
- widma UV i Vis frakcji po redukcji podsiarczynem sodu (IE England) w środowisku alkalicznym (0,5 M NaOH);
- widma w podczerwieni poszczególnych frakcji.

### **Oznaczanie stężenia PQ i frakcji GX**

Zakres oznaczanych stężeń wynosił 2,5–80 mmol/l. Po redukcji PQ podsiarczynem w środowisku alkalicznym zmierzono absorpcje uzyskanego barwnego roztworu przy  $\lambda = 602$  nm. Wykonano krzywe absorpcji:

- po rozdziale chromatograficznym na złożu Sephadex G-50 (Pharmacia, Szwecja) z elucją 0,2 mol/l buforem  $K^+$ -fosforanowym o pH 7, zakres stężeń PQ nanoszonych na kolumnę 0,02–1,0 mmol/l;
- bezpośrednio z roztworów o zakresie stężeń jak wyżej na podstawie tej krzywej odczytano stężenie PQ w eluacie.

Dla oznaczenia stężenia frakcji 4 i 5 wykonano krzywą bezpośrednio z roztworów bez czynnika redukującego przy  $\lambda = 224$  nm.

### **Badanie wiązania frakcji GX z Hb**

Badanie wiązania wykonano metodą prostego rozdziału wolnego ligandu od kompleksu ligand-białko. Na podstawie różnic zawartości PQ we frakcji a ilości naniesionego obliczono:

- wartość  $r$  czyli stopień wiązania wyrażony jako średnia liczba cząsteczek ligandu związana przez jedną cząsteczkę białka,
- wartość  $L$  czyli równowagowe stężenie ligandu [7].

W celu zbadania wiązania frakcji GX z Hb zastosowano metodę chromatografii kolumnowej na złożu Sephadex G-50, kolumna o wymiarach 30x1 cm, rozdział w 0,2 mmol/l buforze  $K^+$ -fosforanowym o pH 6,0; 7,0; 8,0. Zawartość PQ oznaczano po redukcji podsiarczynem w środowisku alkalicznym przy  $\lambda = 602$  nm. Zakres stężeń PQ 0,1–1,0 mmol/l, stężenie Hb stałe – dla Hb A 50 mM, dla Hb Cc 25 mM. Próbkę z PQ, GX i frakcjami GX inkubowano 0,5 h.

### **Badanie wpływu frakcji Gramoxonu na hemoglobiny**

Próbki Hb inkubowano z PQ, Gx i z frakcjami GX odpowiednio od 0,5 do 3 h w temperaturze 37°C. Po skończonej inkubacji wykonano widma każdej próbki w zakresie 450–700 nm. Zakres stężeń jak wyżej.

*Analiza statystyczna wyników [15]*

Liniovą zależność pomiędzy badanymi zmiennymi oceniano na podstawie wartości współczynnika korelacji  $R$ :

$$R = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Proste regresji wyznaczano metodą najmniejszych kwadratów, a współczynniki obliczano ze wzorów:

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum (x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n}$$

Błędy parametrów obliczono na podstawie wzorów:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_a = S_y \sqrt{\frac{\sum (x_i)^2}{n \sum (x_i^2) - (\sum x_i)^2}}$$

$$S_b = S_y \sqrt{\frac{n}{n \sum (x_i^2) - (\sum x_i)^2}}$$

gdzie:

$x_i, y_i$  – współrzędne oznaczeń jednostkowych,

$n$  – liczebność par  $x, y$ ,

$n - 2$  – liczba stopni swobody,

$Y_i$  – obliczone wartości  $y$  z równania prostej regresji.

Oceny istotności różnic wartości średnich dokonano za pomocą testu t-Studenta dla różnej liczby pomiarów:

$$t_a = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

gdzie:

$n_1, n_2$  – liczba pomiarów w seriach,

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$  – średnie wyników serii 1 lub 2,

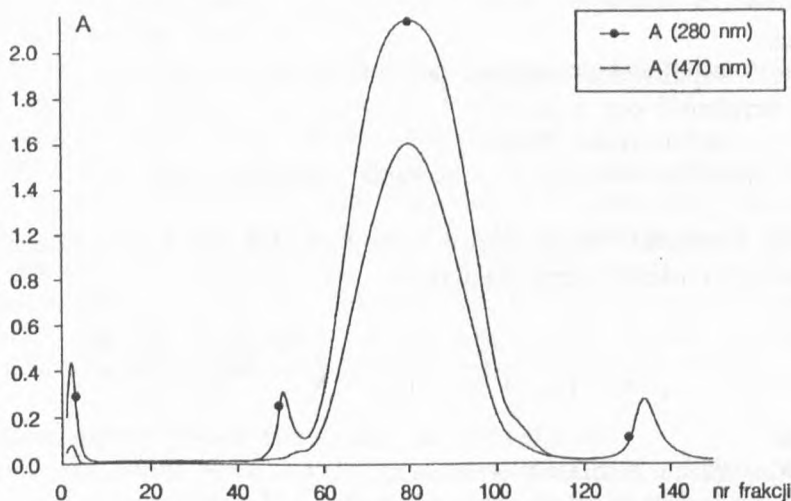
$s_1^2, s_2^2$  – odchylenia standardowe serii 1 lub 2.

Widma UV i Vis wykonano dwuwieżkowym programowanym spektrofotometrem SPECORD M-40 (Carl Zeiss Jena). Widma IR wykonano dwuwieżkowym spektrofotometrem SPECORD 71 IR (Carl Zeiss Jena). Pomiary punktowe UV i Vis oraz pomiary związane z chromatografią kolumnową wykonano jednowieżkowym spektrofotometrem SPECTROMOM 195D (MOM, Węgry), z zastosowaniem kuwet przepływowych i automatycznego rejestratora absorpcji.

#### 4. WYNIKI

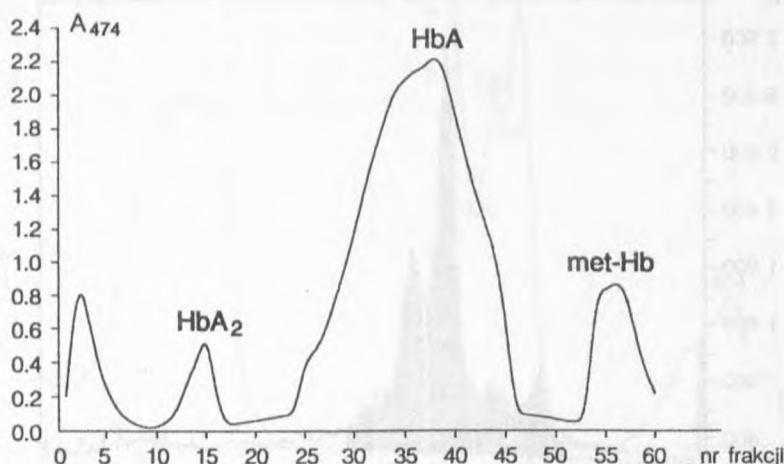
##### *Izolowanie i oczyszczanie hemoglobiny*

Izolowanie hemoglobiny z bezjądrzastych erytrocytów człowieka nie nastręcza większych trudności. W przypadku erytrocytów zawierających aparat jądrowy, po lizie wykonanej w sposób standardowy z użyciem toluenu, preparat Hb wymagał oczyszczenia z innych białek oraz kwasów nukleinowych za pomocą sączenia molekularnego na złożu Sephadex G-100 (Pharmacia, Szwecja). Po chromatografii otrzymano oprócz frakcji Hb (główny pik) także pik eluowany w objętości V (M. cz. > 100 000), który zidentyfikowano na podstawie widm absorpcyjnych jako kompleksy nukleo-protein z białkami hemowymi. Przed frakcją Hb eluowany był pik, który zawierał zdegradowaną Hb lub cząsteczki Hb, których konformacja została zmieniona pod wpływem toluenu. Pewna ilość cząsteczek Hb po przeprowadzeniu lizy z użyciem rozpuszczalnika organicznego ulega trwałemu z nim związaniu [10]. Jako ostatnia eluowana była frakcja zawierająca zdegradowane odcinki kwasów nukleinowych i różnych białek (rys. 1).



Rys. 1. Profil rozdziálu chromatograficznego Hb karpia na kolumnie z Sephadexem G-100

Rozdział Hb człowieka na kolumnie ze złożem Celuloza CM-32 w gradencie pH umożliwił otrzymanie czystej frakcji HbA. Po elucji otrzymano kilka pików (rys. 2 i 3):



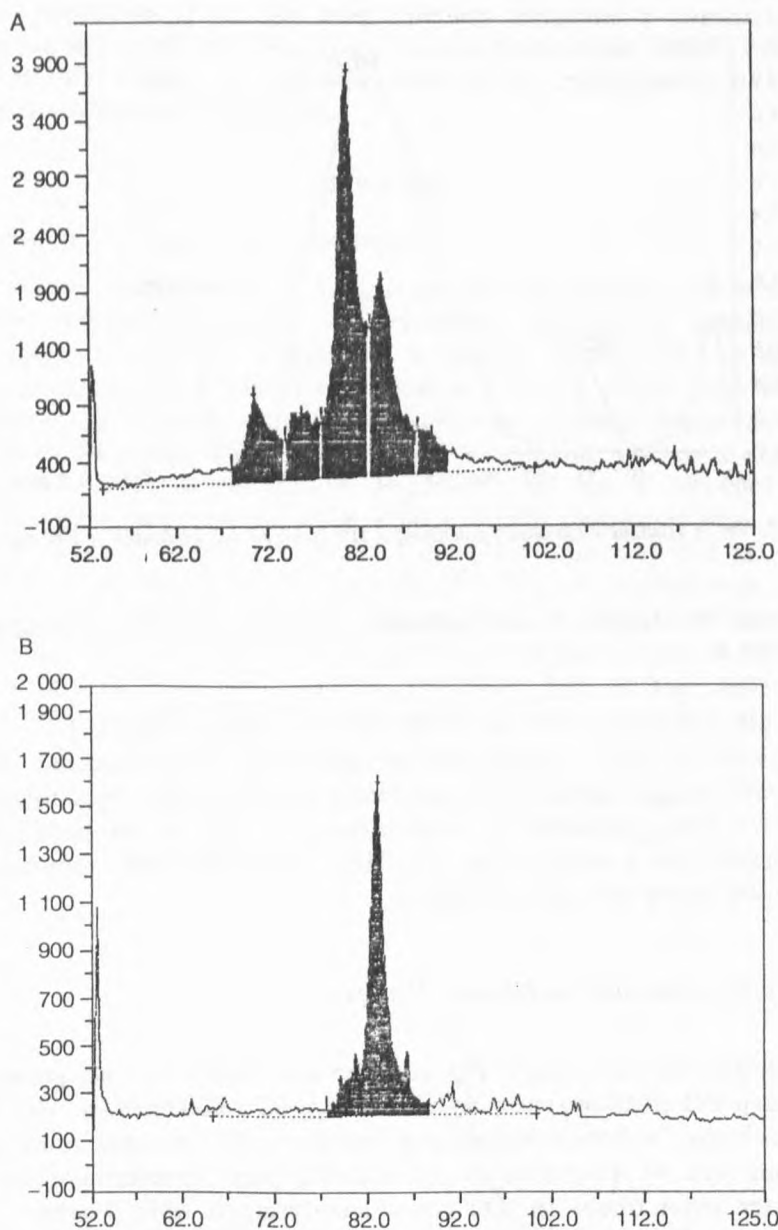
Rys. 2. Profil rozdziału chromatograficznego Hb ludzkiej na kolumnie z CM-celulozą

- 1 – pik zawierający białka niehemowe i luźno związane z hemem,
- 2 – HbA<sub>2</sub> pH ~ 6,9,
- 3 – HbA<sub>1</sub> pH ~ 7,05,
- 4 – pik zawierający Hb w formie met i zdenaturowaną pH ~ 7,5.

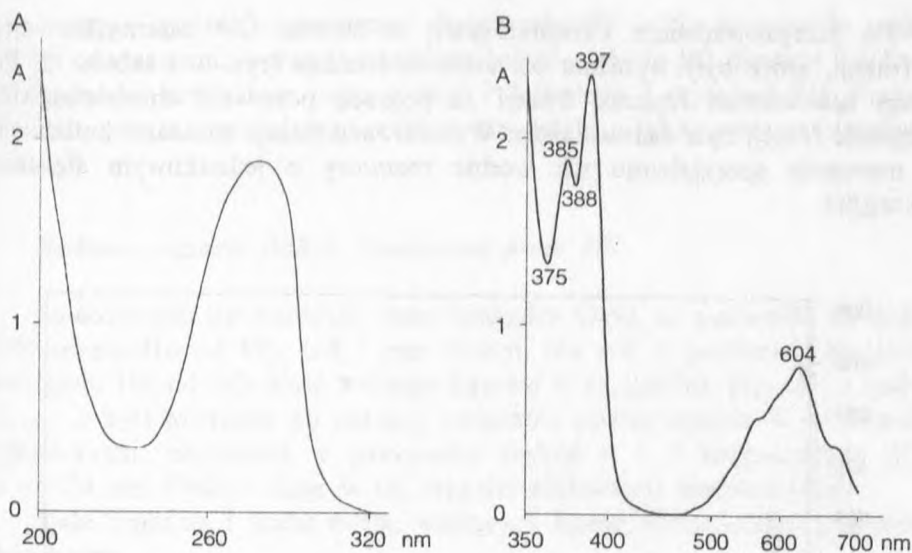
Oczyszczona HbCc ulegała bardzo szybkiemu samoutlenieniu, dlatego do dalszych badań używano jedynie formę *met*-Hb, która była mieszaniną składników HbCc trudnych do rozdzielania z uwagi na ich podobieństwo funkcjonalne, jak i strukturalne [8]. HbA człowieka była stabilna i nie wykazywała szybkiego samoutlenienia.

#### *Ilościowe oznaczanie zawartości Paraquat*

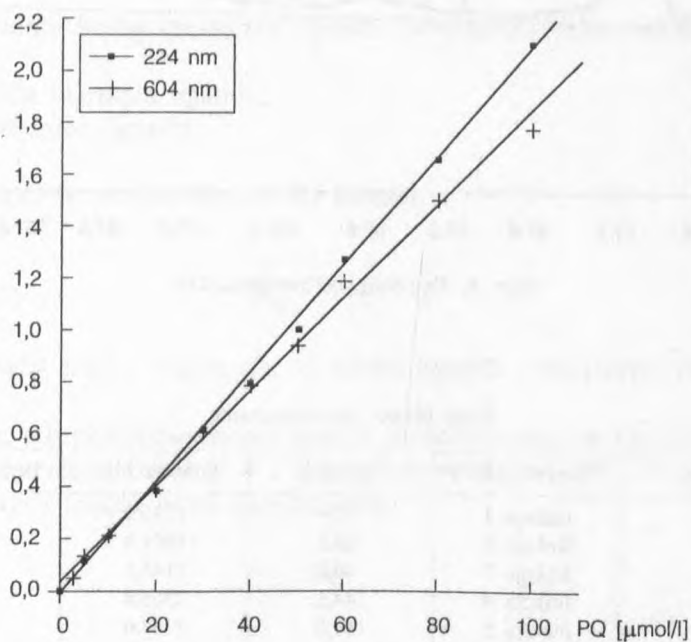
Do ilościowego oznaczania PQ używano jego formy barwnej powstającej po redukcji PQ podsiarczynem sodu w środowisku alkalicznym. Tak otrzymana pochodna wykazuje maksima w 385 nm i 397 nm oraz słabe pasmo w 604 nm (rys. 4). Pochodna ta jest stabilna przy ograniczonym dostępie tlenu przez okres około 1h. Do celów analitycznych wykorzystano pasmo 602 nm, co umożliwiło ilościowe oznaczanie PQ w zakresie stężeń 2,5–100 mmol/l. Otrzymana krzywa wzorcowa nie wykazywała odstępstw od prawa Lamberta-Beera (rys. 5).



Rys. 3. Densytogram rozdziału Hb ludzkiej: A – nieoczyszczony hemolizat Hb, B – oczyszczona frakcja HbA



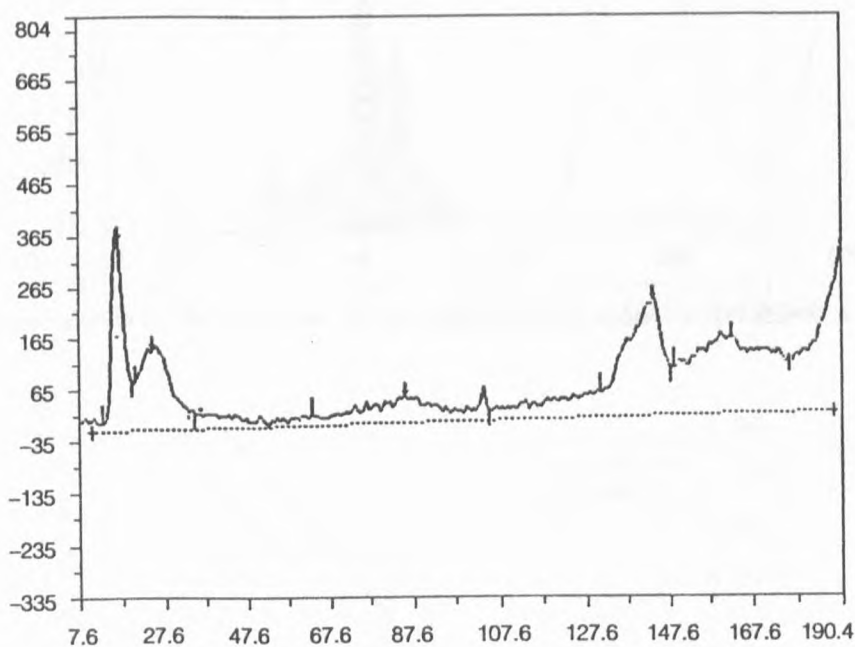
Rys. 4. Widma PQ: A – widmo PQ bez podsiarczyny, B – widmo PQ po redukcji podsiarczynem



Rys. 5. Krzywa wzorcowa PQ w zakresie 2,5–100  $\mu\text{mol/l}$

### *Otrzymywanie oczyszczonych frakcji Gramoxonu*

Po przeprowadzeniu chromatografii w świetle UV zidentyfikowano 5 frakcji, które były wyraźnie od siebie oddzielone (rys. 6. i tabela 1). Po elucji sprawdzono czystość frakcji za pomocą ponownej chromatografii. Czystość frakcji była zadowalająca. Wyizolowane frakcje poddano liofilizacji, a następnie sporządzono ich wodne roztwory o jednakowym stężeniu 26 mg/ml.



Rys. 6. Densytogram rozdziału GX

Tabela 1

Lista pików chromatogramu

| Frakcja | Nazwa piku | Y-pozycja | Powierzchnia | % powierzchni |
|---------|------------|-----------|--------------|---------------|
| 1       | frakcja 1  | 17,4      | 1290,9       | 13,4          |
| 2       | frakcja 2  | 25,2      | 1401,8       | 14,7          |
| 3       | frakcja 3  | 86,0      | 1145,5       | 12,2          |
| 4       | frakcja 4  | 144,1     | 2305,8       | 24,3          |
| 5       | frakcja 5  | 163,0     | 3364,0       | 35,4          |

### Identyfikacja frakcji Gramoxonu

Badania spektrofotometryczne w zakresie UV i Vis dostarczyły widm, które jednoznacznie wskazują na różny stopień rozbicia PQ. Frakcje 1 i 2 odpowiadałyby produktom polimeryzacji PQ, frakcja 3 czystemu PQ. Frakcje 4 i 5 są produktami dalszego rozbicia bipirydyli a także zanieczyszczeniami (rys. 7).

### Badanie wiązania frakcji Gramoxonu przez Hb

Zastosowano do rozdzielu żelę Sephadex G-50, co pozwoliło na dobre oddzielenie Hb od PQ, GX i jego frakcji. Na rys. 8 przedstawiono profil rozdzielu Hb od PQ. Ilość wolnego ligandu w przypadku PQ, GX i frakcji 1, 2 i 3 była mierzona po redukcji związków podsiarczynem w środowisku alkalicznym, natomiast w przypadku frakcji 4 i 5 bezpośrednio przy  $\lambda = 224$  nm (frakcje mają w tej długości maksimum pochłaniania).

Stałe wiązania i liczbę miejsc wiążących ligand obliczono na podstawie zależności:

$$r = \frac{[L]/k}{1 + [L]/k}$$

$r$  – średnia liczba cząsteczek ligandu związanego przez jedną cząsteczkę białka;

$k$  – stała wiązania ligandu;

$[L]$  – stężenie ligandu.

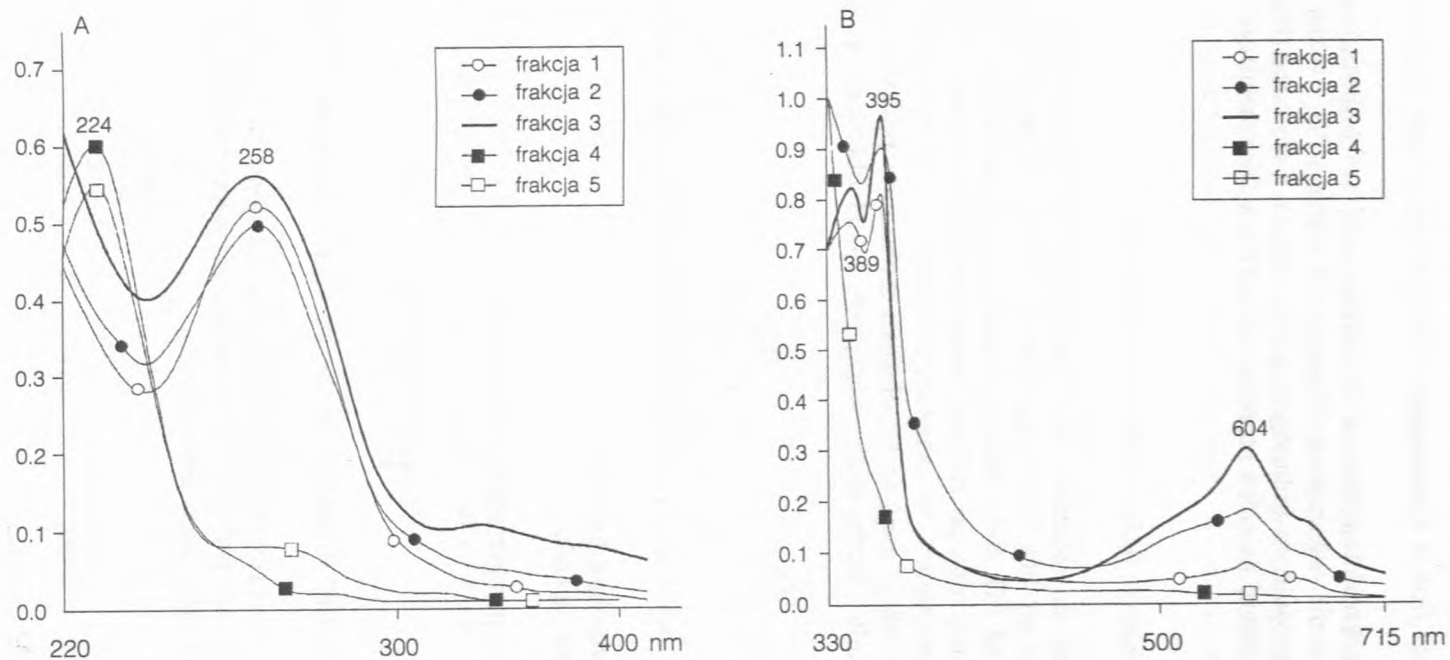
Zależność tę przekształcono do postaci:

$$\frac{r}{[L]} = -\frac{r}{k} + \frac{n}{k}$$

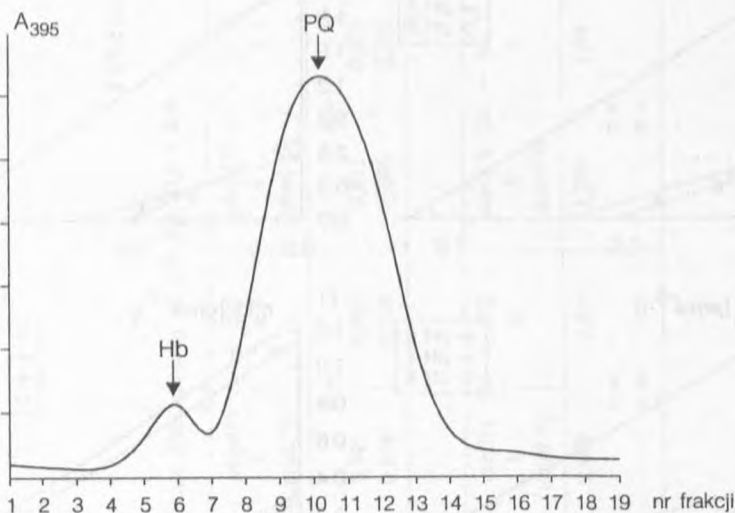
$n$  – liczba miejsc wiążących, tj. liczba ligandu związanego przez 1 mol białka.

Wyniki tak przeprowadzonej analizy przedstawiono na rys. 9 i w tab. 2.

Brak danych dla frakcji 4 i 5 spowodowany jest tym, że nie wykryto wiązania tych frakcji przez hemoglobiny.



Rys. 7. Widma frakcji Gramoxonu: A – widma frakcji GX, B – widma frakcji GX po redukcji

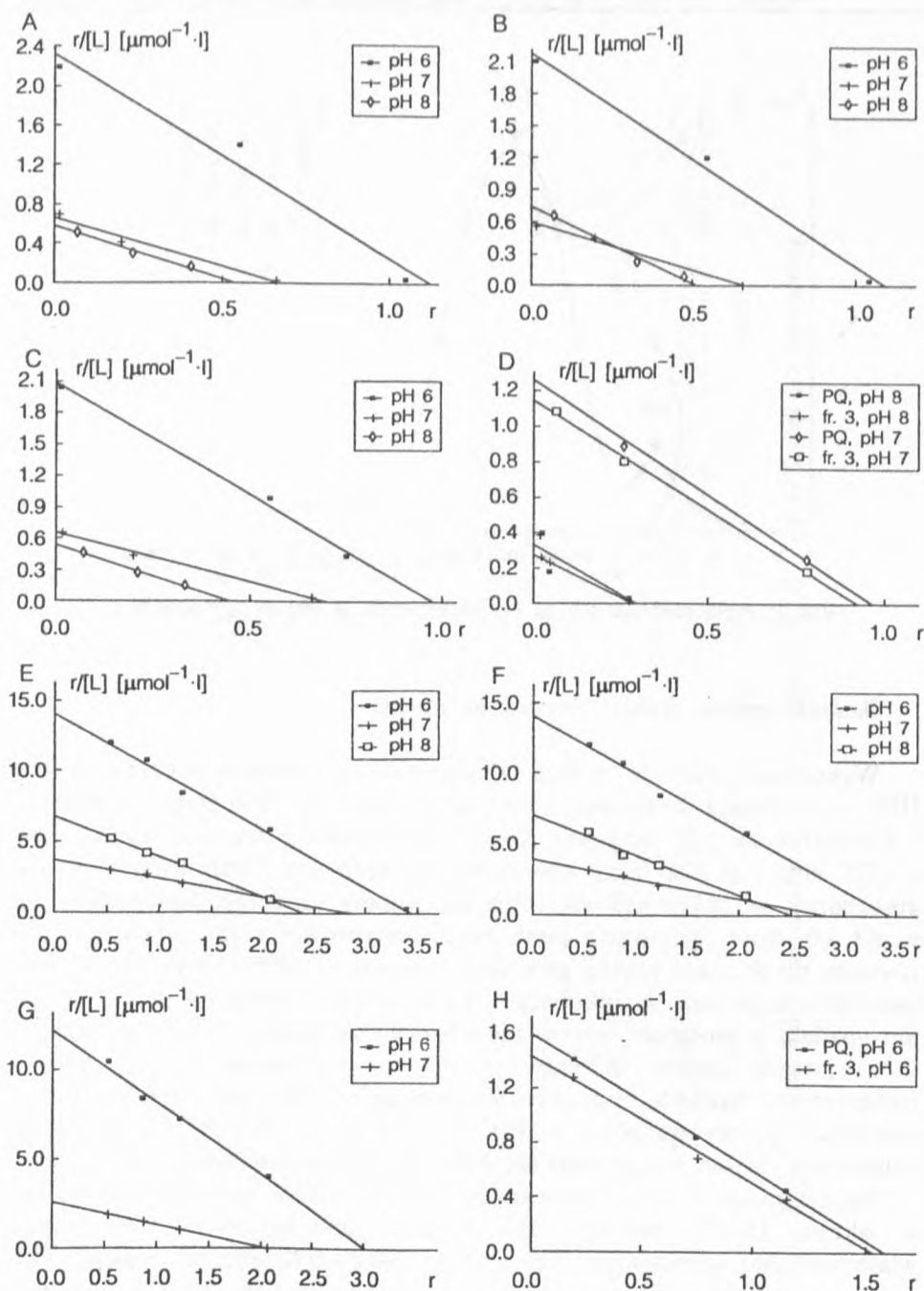


Rys. 8. Profil rozdziálu Hb od PQ na kolumnie ze złożem Sephadex G-50

#### Badanie wpływu frakcji Gramoxonu na Hb

Wykonano cykliczne widma absorpcyjne w zakresie widzialnym dla HbCc (mieszanina formy *oksy* i *met*, zawierająca ok. 70% formy utlenionej) i wykazano, że pod wpływem frakcji GX następuje wyraźny zanik pasm  $\alpha$  (575 nm) i  $\beta$  (540 nm), charakterystycznych dla formy *oksy* i wzrost absorbancji w 505 i 630 nm. Opisane zmiany najslabiej uwidoczniły się w pH 8,0. Brak zachowania punktów izobestycznych widm świadczy o pojawianiu się w czasie reakcji produktów innych niż *oksy*- i *met*-Hb. Widma *met*-HbCc uzyskane po inkubacji z frakcjami GX wykazują w 505 i 630 nm spadek, a następnie wzrost absorbancji, natomiast w 545 nm wzrost, który powoli zanikał. Również i tutaj nie zachowane zostały punkty izobestyczne. Badania obu układów mieszaniny *oksy/met* HbCc i formy *met*-HbCc przeprowadzono w pH 6,0, 7,0 i 8,0. W pH 6,0 następuje denaturacja białka czego objawem było postępujące zmętnienie roztworu.

Po inkubacji HbA z uzyskanymi frakcjami GX sporządzono widma w zakresie 450–700 nm (rys. 10). Analiza widm zgodnie z zakładanymi właściwościami utleniającymi PQ, a także frakcji GX jako pochodnych PQ, wskazuje na pojawianie się znacznych ilości form *met*-Hb (spadek absorpcji w 540 i 576 nm, wzrost w pasmach 500 i 630 nm). Najszybciej reakcja zachodzi z PQ, GX, frakcją 1, 2 i 3. W przypadku frakcji 4 i 5 przyrost zaobserwowano dopiero po 4 h inkubacji.



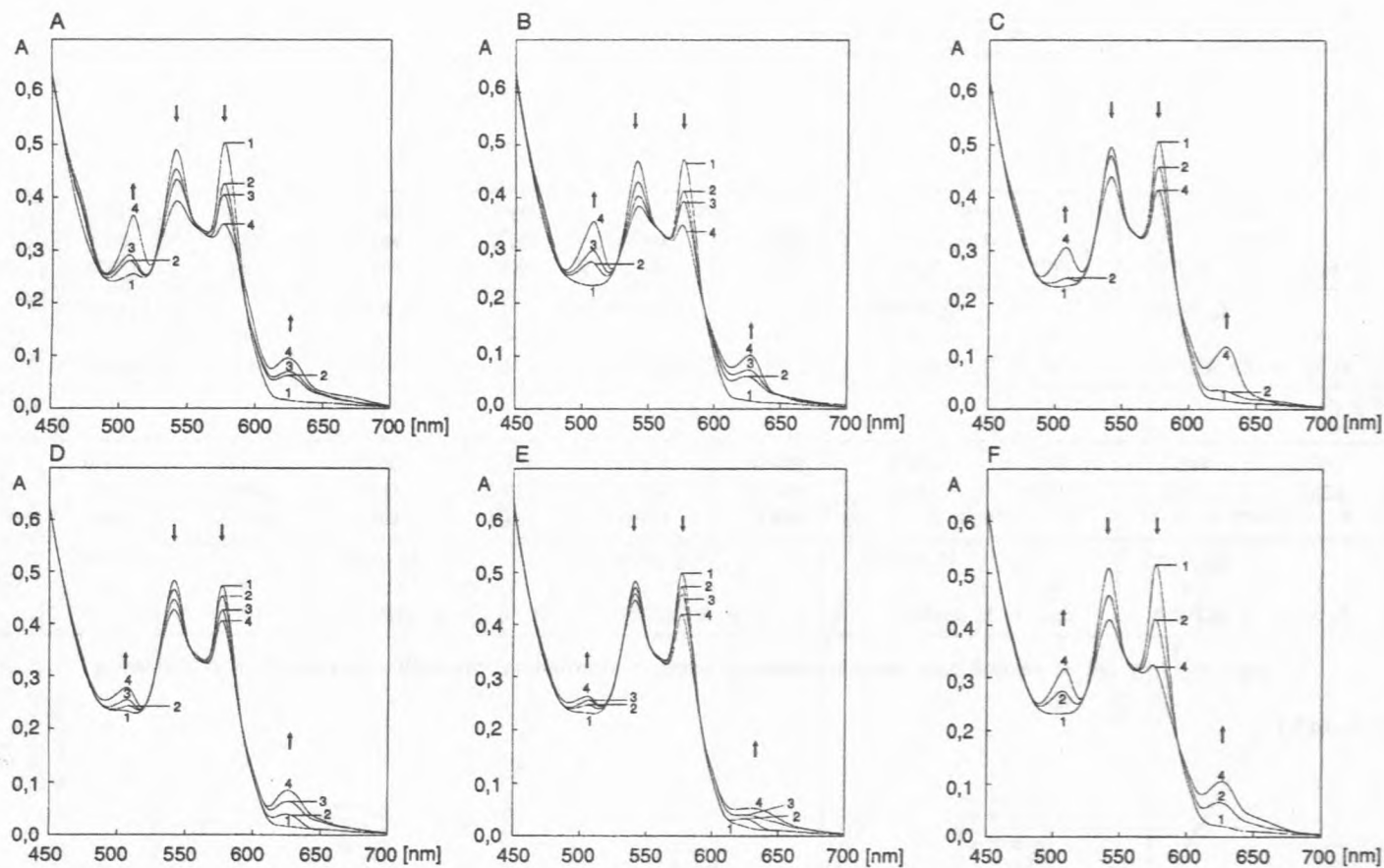
Rys. 9. Krzywe Scatcharda: A - *oksyHb A* + GX, B - *oksyHb A* + frakcja 1, C - *oksyHb A* + frakcja 2, D - *oksyHb A*, E - *metHb Cc* + GX, F - *metHb Cc* + frakcja 1, G - *metHb Cc* + frakcja 2, H - *metHb Cc*

Tabela 2

Parametry ( $k$  i  $n$ ) wiązania Paraquat, Gramoxonu i frakcji Gramoxonu przez hemoglobiny w pH 6,0, 7,0 i 8,0

| pH | oksyHb A + Gx                   |       | oksyHb A + fr. 1                |       | oksyHb A + fr. 2                |       | oksyHb A + PQ                   |       | oksyHb A + fr. 3                |       |
|----|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|
|    | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$   | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$   | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$   | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$   | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$   |
| 6  | 0,484                           | 1,126 | 0,509                           | 1,107 | 0,472                           | 0,984 | n.w.                            |       | n.w.                            |       |
| 7  | 1,093                           | 0,665 | 1,147                           | 0,679 | 1,085                           | 0,704 | 0,791                           | 0,963 | 0,811                           | 0,929 |
| 8  | 0,929                           | 0,539 | 0,899                           | 0,521 | 0,833                           | 0,448 | 0,898                           | 0,298 | 1,046                           | 0,293 |

| pH | metHb Cc + Gx                   |      | metHb Cc + fr. 1                |      | metHb Cc + fr. 2                |      | metHb Cc + PQ                   |      | metHb Cc + fr. 3                |      |
|----|---------------------------------|------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|
|    | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$  | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$  | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$  | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$  | $k$<br>[ $\mu\text{mol}^{-1}$ ] | $n$  |
| 6  | 0,360                           | 2,43 | 0,362                           | 2,54 | 0,806                           | 2,08 | 0,988                           | 1,60 | 1,069                           | 1,54 |
| 7  | 0,789                           | 2,92 | 0,744                           | 2,88 | 0,248                           | 3,06 | n.w.                            |      | n.w.                            |      |
| 8  | 0,247                           | 3,48 | 0,246                           | 3,46 | n.w.                            |      | n.w.                            |      | n.w.                            |      |



Rys. 10. Widma Hb A po inkubacji z frakcjami GX: A – Hb A + frakcja 1, B – Hb A + frakcja 2, C – Hb A + frakcja 3, D – Hb A + frakcja 4, E – Hb A + frakcja 5, F – Hb A + GX

## 5. DYSKUSJA

Ze względu na specyficzne właściwości strukturalne i funkcjonalne Hb, zależne m. in. od stężenia jonów wodorowych, przeprowadzono badania wpływu PQ, Gx i produktów jego degradacji na Hb w różnych pH. Badania spektrofotometryczne wykazały, że PQ, GX i otrzymane frakcje GX powodują obniżenie intensywności pasm  $\alpha$  i  $\beta$  oksy-Hb i wzrost absorpcji w 500 i 630 nm. Szybkość zaniku formy utlenowanej była największa dla Hb karpia w pH 7, mniej podatna okazała się HbA człowieka. W pH 6 postępujący proces denaturacji Hb karpia utrudniał analizę widm otrzymanych po czasie dłuższym niż 2 h. Uzyskane wyniki potwierdzają dane literaturowe, że podatność Hb karpia na utlenianie i denaturację wzrasta wraz z obniżeniem pH środowiska [13]. PQ i otrzymane z Gx frakcje 3, a szczególnie 4 i 5 wykazywały mniejszą efektywność działania w porównaniu z GX i jego frakcjami 1 i 2 Gramoxonu. Widma absorpcyjne pochodnych *met*-Hb z PQ, GX i jego frakcjami wykazują spadek w 505 i 630 nm, a następnie wzrost: w 545 nm – kolejno wzrost a później spadek. Zarówno w czasie reakcji oksy-, jak i *met*-Hb nie zostają zachowane punkty izobestyczne. W zakresie UV następuje spadek intensywności pasma w 290 nm i wzrost w 275 nm, co świadczy o utracie natywności przez cząsteczkę Hb – denaturacja globiny [1]. Porównanie widm Hb po reakcji z PQ i GX, z widmami po reakcji z  $H_2O_2$  prowadzi do wniosku, że jednym z produktów reakcji są wysokoutlenione pochodne Hb. Obok formy oksy- i *met*- pojawia się przejściowa forma *ferryl*-Hb [4, 5, 14]. Zawartość formy ferrylowej rośnie powoli a po osiągnięciu pewnego maksimum szybko maleje.

Na podstawie różnic w wiązaniu badanych ligandów przez Hb należy przypuszczać, że w pH 7,0 i 8,0 oddziaływania mają charakter jonowy (ładunek–ładunek), natomiast w pH 6,0 dochodzą jeszcze oddziaływania hydrofobowe. Podobną zależność stwierdzono w przypadku NADPH, 2,3-DPG i pentakarboksyłanu benzenu [10, 12]. Otrzymane stałe wiązania dla PQ, GX i jego frakcji są o rząd wielkości większe niż dla 2,3-DPG lub NADPH. Przeprowadzone badania nie rozstrzygają, czy za wiązanie PQ odpowiedzialne są te same reszty aminokwasowe co w przypadku przyłączania fosforanów organicznych. Stwierdzone zależności od wartości pH sugerują udział w tym procesie reszt histydyny, szczególnie ze względu na silniejsze wiązanie GX przez Hb karpia.

PQ, GX i frakcje GX po reakcji z Hb i usunięciu jej metodą sączenia molekularnego, posiadają taki sam przebieg widm absorpcyjnych, jak przed reakcją. Także po redukcji podsiarczynem widma wykazują obecność charakterystycznych pasm w 389, 395 i 603 nm oraz załamień na ramionach w 537 i 644 nm [9].

Identyfikacja frakcji GX przeprowadzona w oparciu o widma w podczerwieni, widma UV i Vis oraz na podstawie wyników oddziaływania z Hb daje podstawę do następujących wniosków:

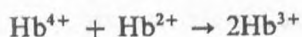
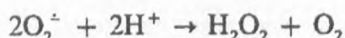
– frakcje 1 i 2 są produktami polimeryzacji PQ o różnym stopniu polimeryzacji;

– frakcja 3 jest niezdegradowanym PQ;

– frakcje 4 i 5 są niespolimeryzowanymi produktami degradacji PQ.

Reakcja PQ z jonem Fe hemu powoduje generowanie rodnika  $PQ^{\cdot+}$ , jego wytworzenie może też nastąpić w wyniku pseudoperoksydazowej aktywności Hb, tak jak to jest sugerowane w przypadku jonu 1-metylo-4-fenyl-2,3-dihydropirydynowego (MPDP<sup>+</sup>) [6]. Pod wpływem rodnika PQ przy dostępie tlenu powstaje rodnik nadadtlenkowy  $O_2^{\cdot-}$ , jego spontaniczna dysmutacja prowadzi do wytworzenia nadtlenu wodoru, który w reakcji z Hb powoduje m. in. powstawanie pochodnej ferrylowej [4, 5]. Należy tu także uwzględnić proces denaturacji białka wywołany głównie przez rodnik  $^{\cdot}OH$ . Rodnik ten ze względu na swoją wysoką reaktywność przejawia aktywność przede wszystkim w obrębie kieszeni hemowej Hb [14]. Prawdopodobny udział  $H_2O_2$  i  $^{\cdot}OH$  w opisywanych reakcjach sugeruje również destrukcję aminokwasów siarkowych (Cys) i aromatycznych (głównie Trp) [3, 4, 5].

Schemat 3. Proponowany schemat reakcji PQ z Hb



Wykonane badania wskazują na istotne znaczenie Hb w transporcie PQ i jego produktów degradacji (przede wszystkim produktów degradacji) do różnych tkanek. Silniejsze wiązanie tych ligandów przez Hb karpia potwierdza, że ryby są bardziej czułe na zatrucie pochodnymi bipirydyli w porównaniu z ssakami.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Demczenko A. P. (1981), *Fioletowaja spektroskopofotometrija i struktura bielkow*, Kijew, 44-69.
- [2] Drabkin D. L. (1946), Spectrophotometric studies. XIV The Crystallographic and Optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species, *J. Biol. Chem.* **164**, 703-723.
- [3] Duda W. (1985), *Modyfikacje struktury pierwszorzędowej i właściwości hemoglobiny krowy (Bos taurus) pod wpływem promieniowania  $\gamma$* , Łódź, 132.
- [4] Duda W. (1992), *Comparative studies of paraquat interactions with fish and bovine oxy- and deoxyhemoglobins*, *Acta Univ. Lodz. (Folia biochimica et biophysica)*, **9**, 53-63.
- [5] Duda W., Osmulski P. A. (1992), *Studies on paraquat and gromoxone interactions with hemoglobins*, *Acta Univ. Lodz. (Folia biochimica et biophysica)*, **9**, 65-76.
- [6] Korytkowski W., Felix C. C., Kalynarman B. (1987), *Evidence for the one-elektron oxidation of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP<sup>+</sup>)*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **147**, 354-360.
- [7] Kozik A. (1983), *Chromatograficzne i elektroforetyczne metody wyznaczania parametrów oddziaływania białko-ligand*, *Post. Bioch.*, **29/1**, 33-47.
- [8] Lin M. I., Noble R. W., Winterhalter K. H., Di Iorio E. E. (1988), *Effects of ligand size on pH and organic phosphate-dependent affinity changes in carp hemoglobin as measured by isonitrile binding*, *Biochim. Biophys. Acta*, **954**, 74-81.
- [9] Nemcsok J., Orbani L., Aszlos B., Buzas Z., Nemeth A. (1985), *Investigations on paraquat toxicity in Fishes*, *Water Int.*, **10**, 79-81.
- [10] Ogo S. H., Focesi J. R., Cashion R., Bonaventura C., Bonaventura J. (1987), *Fluorescence studies on the binding of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate to human Hemoglobin A and its variante hemoglobin providence*, *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **10**, 105-120.
- [11] Riggs A., Bonaventura C., Bonaventura J. (1981), *Preparation of blood hemoglobins of vertebrates*, [w:] *Methods in enzymology*, ed. Antonini E., Rossi-Bernardi L., Chiancone E., t. 76, New York, 5-29.
- [12] Rucci E. (1974), *Electrostatic of hemoglobin and Benzenpentacarboxylate*, *Eur. J. Biochem.*, **138**, 555-560.
- [13] Shikama K. (1985), *Nature of the FeO bonding in myoglobin: An overview from physical to clinical biochemistry*, *Experient*, **41**, 701-706.
- [14] Winterbourn C. C. (1985), *Free-Radical production and oxidative reactions of hemoglobin*, *Environ. Health Perspect.*, **64**, 321-330.
- [15] Zgierski A., Gondko R. (1983), *Obliczenia biochemiczne*, Warszawa, 9-47.

Wpłynęło do Redakcji  
„Folia biochimica et biophysica”  
23.10.1996

Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

*Piotr Duchnowicz, Wirgiliusz Duda*

# STUDIES ON DEGRADATION PRODUCTS OF PARAQUAT AND GRAMOXONE INTERACTIONS WITH HUMAN AND CARP HEMOGLOBINS

In this work the effect of Paraquat (PQ) and Gramoxone (GX) on isolated human and carp hemoglobins was studied. Degradation products of PQ were isolated from GX solution by thin layer chromatography on silica gel platelets. Purity of the GX fractions obtained was verified on the basis of silica gel rechromatography. The fractions were identified by IR, UV and visible spectra. Binding of PQ degradation products to hemoglobin was studied by molecular filtration through a Sephadex G-50 column. Interaction of GX fractions with hemoglobin was studied by the spectrophotometric method. Absorption spectra were recorded in the  $\lambda = 200-900$  nm range in 30-min intervals, between 0 and 3 hrs of incubation. Effect of pH of the medium on the amount of hemoglobin-bound ligand was determined, and the reactivity of the GX fractions obtained was compared with those of PQ and GX. Conditions of the strongest and the weakest binding of the ligands were identified. The studies performed point to a considerable importance of Hb in the transport of PQ and its degradation products to various tissues. The stronger binding of these ligands by carp Hb confirms that fishes are more sensitive to poisoning by bipyridyl derivatives as compared with mammals (primates).