

Таблица 5 — Годовое потребление грибов и молока ( $KП_{гр} = 16 \times 10^{-3}$  и  $KП_{мол} = 0,1 \times 10^{-3}$ ), кг, л/год

Продукт	Категория НП			
	A (< 0,5)	B (0,5–2)	C (2–4)	D (4–10)
Грибы	1	4	10	18
Молоко	80	300	750	1200

Действительно, если принять, что для категории В расчетное потребление продуктов соответствует среднестатистическому для сельских жителей, то для остальных категорий потребление этих продуктов можно рассматривать как экстремально низкое (А) либо высокое и экстремально высокое (С и D).

#### Заключение

Выполненное исследование показало, что несмотря на то, что верифицируемая модель на сегодня является наиболее совершенной в своем классе, тем не менее, ее адекватность реальным дозам (СИЧ-измерения) не однозначна. Хотя 60 % результатов фактически можно признать удовлетворительными, все же нельзя согласиться с тем, что по неясным причинам модель в 24 % случаев дозы переоценивает в 2–10 раз (400 НП), а в 16 % — существенно их недооценивает. Это обстоятельство следует принимать во внимание, например, при интерпретации оценки эффективности защитных мер и риска отдаленных последствий облуче-

ния малыми дозами. Это констатация существующего положения. Следует надеяться, что дальнейшая работа над моделью позволит снизить неопределенность расчетного метода.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Концепция защитных мер в восстановительный период для населения, проживающего на территории Республики Беларусь, подвергшейся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС. — Мн., 2005.
2. Использование электронных карт загрязнения молока для оптимизации системы радиационного контроля. Проблемы радиологии загрязненных территорий / Ю. М. Жученко [и др.] // Юбилейный тематический сборник РНИУП «Институт радиологии». — Гомель, 2006. — Вып. 2. — С. 70–79.
3. Реконструкция среднегрупповых и коллективных накопленных доз облучения жителей населенных пунктов Беларуси, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС: метод. указания. — Мн., 2003.
4. Remediation Strategies for Contaminated Territories Resulting from the Chernobyl Accident. Final Report for the contract B7-5200/ 97/000646/ MAR/C3 of the European Commission / P Jacob [et al.]. — March, 2001. — 316 p.
5. Правила ведения агропромышленного производства в условиях радиоактивного загрязнения земель Республики Беларусь на 2002–2005 гг. / Мин-во сел. хоз-ва и продовольствия РБ. — Мн., 2002. — 74 с.

Поступила 17.11.2010

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 53.082.56:612.396.13

### ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ СОБСТВЕННОЙ И ЗОНДОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

П. А. Авдеев<sup>1</sup>, В. А. Игнатенко<sup>2</sup>, Ю. В. Корноушенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины

<sup>2</sup>Гомельский государственный медицинский университет

Показания интенсивности зондовой флуоресценции снижаются с ростом концентрации глюкозы в растворе белка. Данное изменение зондовой флуоресценции наиболее вероятно обусловлено снижением количества связанного с белком АНС. Тогда можно предположить, что с ростом концентрации глюкозы в крови происходит снижение связывающей способности альбумина к другим лигандам.

С ростом концентрации глюкозы показания интенсивности собственной флуоресценции белка снижаются. Связывание глюкозы с белком вызывает изменение перераспределения электронной плотности в белковой глобуле, что способствует внутримолекулярным конформационным перестройкам в белке, на что указывает снижение показаний интенсивности флуоресценции триптофанилов.

**Ключевые слова:** сывороточный альбумин, зонд ANS, спектрометрия, флуоресцентная спектрометрия, глюкоза, флуоресцентные пробы, триптофан.

### EFFECT OF GLUCOSE CONCENTRATION ON THE LEVEL OF PROBE FLUORESCENTION OF BULL AND SERUM ALBUMINS

P. A. Avdeev<sup>1</sup>, V. A. Ignatenko<sup>2</sup>, Yu. V. Kornoushenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gomel State University named after F.Skorina

<sup>2</sup>Gomel State Medical University

The rise of glucose concentration in protein solutions gives a decrease in intensity indices of probe fluorescence. This change of probe fluorescence is most probably caused by the decreased quantity of ANS binded with the

protein. Thus, one can suppose that the rise of glucose concentration in blood initiates the decrease in albumin binding capacity towards other ligands.

The rise of glucose concentration makes the intensity indices of protein fluorescence decrease. The ability of glucose to bind with protein initiates the rearrangement in globule electron density, which promotes intramolecular conformational changes in protein and the decrease of the intensity indices of tryptophan fluorescence to testify that.

**Key words:** serum albumin, ANS probe, spectrometry, fluorescence spectrometry, glucose, probe fluorescence, tryptophan.

### Введение

Роль сывороточного альбумина в организме человека и животных разнообразна. Интерес, проявляемый к этому белку, постоянно возрастает в связи с открытием его новых функций для организма.

Важную роль сывороточный альбумин играет в поддержании постоянного онкотического давления плазмы крови, благодаря которому вода удерживается внутри кровеносных сосудов. Альбумин обратимо связывает и переносит самые разнообразные низкомолекулярные вещества и метаболиты, среди которых жирные кислоты, желчные пигменты, окись азота, холестерин, металлы как постоянной ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), так и переменной валентности ( $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ), а также многие лекарственные препараты. При связывании лиганда с альбумином химическая и биологическая активность этого лиганда изменяется. Многие вещества, токсичные в свободной, несвязанной форме значительно снижают свою активность при связывании с альбумином [1].

Альбумин вносит значительный вклад в процессы защиты организма от вредного действия свободных радикалов. Это достигается, в частности, связыванием металлов переменной валентности, в результате чего их радикалообразующая активность уменьшается в сотни раз. Кроме этого, в норме молекула альбумина содержит одну восстановленную SH-группу, которая легко окисляется, в том числе в реакциях с участием радикалов. К тому же альбумин обладает важным свойством уменьшать свертываемость крови. Последние исследования указывают на возможность подавления альбумином апоптоза клеток, что важно для изучения возникновения онкологических и аутоиммунных заболеваний.

Функциональная активность альбумина зависит от конформационного состояния его белковой глобулы. Под влиянием различных физико-химических факторов происходят конформационные перестройки в белке, которые так или иначе изменяют функциональную активность белка [2].

### Основная часть

При модификации альбумина крови изменяются изоэлектрические точки растворимости, способность связывать красители и некоторые другие свойства.

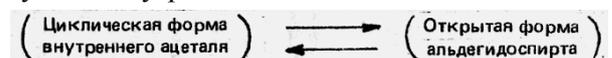
Интерес к реакциям неферментативного гликозилирования белков в организме возрос после обнаружения изменчивости гемоглобина

у больных сахарным диабетом. Аналогичные явления обнаружены и при исследовании других долгоживущих белков.

Ранее было высказано предположение о том, что в русле крови происходят неферментативные реакции альбумина и других белков плазмы с активными метаболитами или посторонними веществами — ксенобиотиками, поступающими в кровь. При этом допускалось, что альбумин является фактором детоксикации [3].

Модельные опыты поставлены с разными веществами, в том числе с альдегидами и хинонами, но особенно показательны эксперименты с ненасыщенным альдегидом цитралем, а также с ацетальдегидом, образующимся в организме при окислении этанола. В результате всех этих реакций, по-видимому, образуются основания Шиффа.

Процесс гликозилирования, который обычно контролируется многими физиологическими механизмами, может быть и неферментативным. В этом случае главная роль принадлежит альдегидной группе глюкозы и других моносахаров, образующих внутренние альдоли.



Хотя равновесие резко смещено влево, все же в растворе содержится какое-то количество альдегидоспирта.

Как оказалось, довольно много белков в организме существуют в форме, связанной с глюкозой через основания Шиффа, с последующей перестройкой Амадори. Глюкоза реагирует со свободными аминогруппами  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминовых групп лизиновых остатков полипептидной цепи [4].

Повышение в крови концентрации глюкозы при сахарном диабете усиливает гликозилирование через основания Шиффа. Впервые это установили, обнаружив при данном заболевании необычный гемоглобин. Позднее было обнаружено, что увеличивается количество одной из минорных фракций гемоглобина. У взрослых этот белок состоит из главной фракции НbА и нескольких минорных. Три из них образуются, вероятно, в результате неферментативного гликозилирования — это гемоглобины  $A1_a$ ,  $A1_b$ ,  $A1_c$ . При диабете их концентрация увеличена в два или три раза, особенно НbА<sub>c</sub>. Остальные фракции гемоглобина также частично гликозилированы. В случае НbА<sub>c</sub> доказано, что гликозилируется  $\beta$ -цепь с N-конца. Механизм реакции обоснован путем

выделения 1-имино-1-дезоксифруктозоксиана. Кроме того, оказалось, что HbA<sub>1c</sub> может фосфорилироваться и образовывать при электрофорезе подфракции A1<sub>c1</sub>, A1<sub>c2</sub>, A1<sub>c3</sub> и др., содержащие именно дезоксифруктозо-6-фосфат. Оба эти гемоглобина обладают низким сродством к кислороду, что аналогично известному влиянию 2,3-дифосфоглицерофосфата. Определение гликозилированных форм гемоглобина имеет прогностическое значение в оценке течения диабета [5].

При диабете неферментативному гликозилированию подвергаются различные белки, в том числе коллаген, мембранные белки, белки крови и другие. В литературных источниках существует тенденция приписывать этому процессу важную роль в развитии осложнений диабета, например, приобретению эритроцитарной мембранной хрупкости, неоднократно отмечаемой у больных диабетом, а также других осложнений (ангиопатия, катаракты и др.). Аналогичные функции гемоглобина можно получить в модельных опытах путем инкубации белка с разными сахарами. По своей активности они располагаются в следующий ряд: рибоза > манноза > галактоза > глюкоза > фруктоза. Другие белки крови (иммуноглобулины и липопротеины) также подвергаются неферментативному гликозилированию. Создается картина разнообразной модификации определенной доли экспонированных и α- и ε-аминогрупп. При этом реакции чаще всего идут через образование оснований Шиффа [6].

**Целью** работы является изучение собственной и зондовой флуоресценции сывороточного альбумина при изменении концентрации глюкозы, взаимодействующей с белком.

#### Материал и методы

Для целей проведения эксперимента был приготовлен раствор бычьего сывороточного аль-

бумина (Sigma-Aldrich) концентрацией 0,66 г/литр ( $10^{-5}$  М) в фосфатном буфере (pH = 7,43). Также были приготовлены навески глюкозы из расчета, что при добавлении их к раствору белка будут получены растворы глюкозы концентрациями 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 мМ.

Измерение показателей собственной и зондовой флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (США). Длину возбуждения для собственной флуоресценции брали равную 296 нМ, при данной длине волны практически полностью всю энергию возбуждения поглощают триптофаны белка. Показатели собственной флуоресценции детектировались на промежутке длин волн от 300 до 650 нМ, что показано на рисунке 3. Длину возбуждения для зондовой флуоресценции брали равную 340 нМ, при которой поглощает связанный с белком флуоресцентный зонд АНС (1-анилино-8-нафталинсульфонат). Показатели зондовой флуоресценции детектировались на промежутке длин волн от 350 до 650 нМ, что показано на рисунке 1. Ширина щелей излучения и поглощения при измерении собственной и зондовой флуоресценции была по 5 нМ.

#### Результаты и их обсуждение

Было изучено влияние возрастающих концентраций глюкозы на показатели зондовой флуоресценции сывороточного альбумина. В качестве флуоресцентного зонда использовался АНС. Так как флуоресцирует только связанный зонд с белком, то по величине интенсивности зондовой флуоресценции можно судить о связывающей способности альбумина.

С помощью спектрофлуориметра был получен график зависимости показателя зондовой флуоресценции БСА при разных концентрациях глюкозы (рисунок 1).

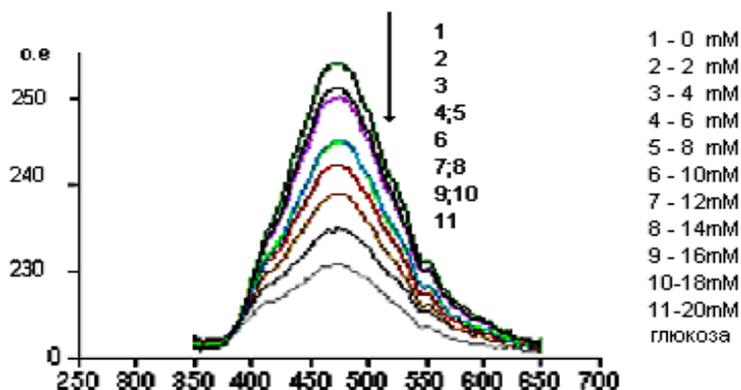
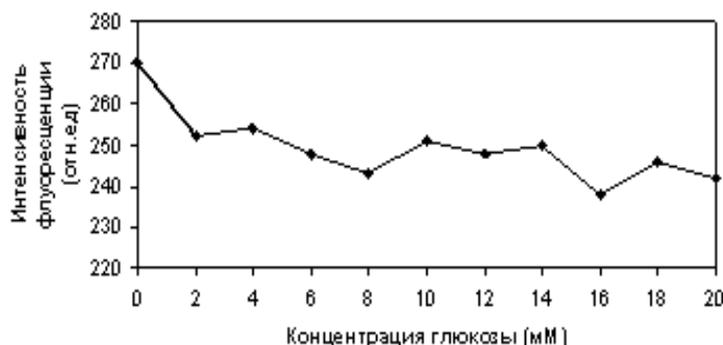


Рисунок 1 — Распределение значений интенсивностей зондовой флуоресценции по длинам волн при разных концентрациях глюкозы

На основе полученных данных, отображенных на рисунке 1, для удобства и большей наглядности нами был построен график

зависимости значений максимумов зондовой флуоресценции от концентрации глюкозы (рисунок 2).



**Рисунок 2 — Изменение значений максимумов зондовой флуоресценции с ростом концентрации глюкозы**

Таким образом, экспериментально продемонстрировано, что с ростом концентрации глюкозы в растворе белка показания интенсивности зондовой флуоресценции снижаются. Данное изменение показателя зондовой флуоресценции может быть наиболее вероятно обусловлено снижением количества связанного с белком АНС. Связь флуоресцентного зонда с белком обусловлена в основном непрочными нековалентными взаимодействиями (гидрофобными, электростатическими), которые являются очень лабильными и неустойчивыми. Незначительные изменения конформации белка под действием различных физических или химических агентов способны повлиять на эти места связывания.

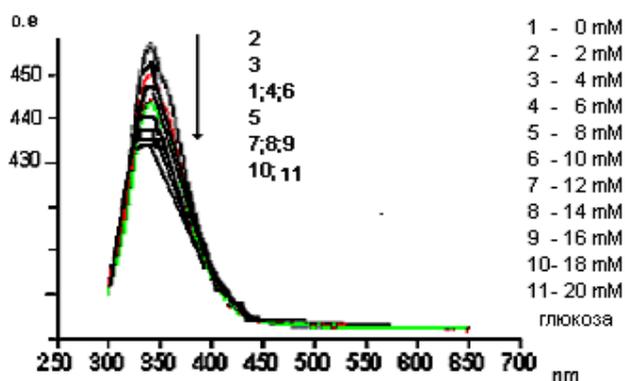
С ростом концентрации глюкозы в растворе происходит увеличение количества гликозилированного белка. Остатки глюкозы способны ферментативным путем связываться с определенными аминокислотами, входящими в состав белка. Считается, что данное взаимодействие осуществляется благодаря ковалентным взаимодействиям, то есть необратимо. Известно также, что связавшиеся ковалентно с белком вещества обуславливают изменение перераспределения электронной плотности в молекуле белка. Это может привести к разрушению нековалентных взаимодействий как внутри белковой глобулы между ее доменами, так и к разрушению нековалентных взаимодействий между белком и другими химическими веществами. Также известно, что слишком большое количество

связавшегося с белком лиганда может приводить к значительному изменению перераспределения электронной плотности в белковой глобуле, что чревато конформационными переходами, вплоть до денатурации данного белка.

Однако характер снижения интенсивности зондовой флуоресценции не находится в линейной зависимости от концентрации глюкозы, что может говорить о каких-либо побочных эффектах такого взаимодействия. Таким образом, при патологиях, сопровождающихся высокими концентрациями глюкозы в крови, может наблюдаться снижение связывающей способности основного транспортного белка крови с различными лигандами, имеющими сходную химическую структуру с АНС.

Гликозилирование белка, то есть ковалентное связывание глюкозы с определенными аминокислотами в белке, также приводит к перераспределению электронной плотности в молекуле белка. При этом было важно узнать, способствует ли гликозилирование изменению конформации белка.

Для выяснения данного вопроса был проведен эксперимент по изучению влияния возрастающих концентраций глюкозы на конформационное состояние белка. Использовали метод собственной флуоресценции сывороточного альбумина, который очень чувствителен к конформационным переходам в сывороточном альбумине. Полученные результаты показаны на рисунке 3.



**Рисунок 3 — Распределение значений интенсивностей собственной флуоресценции по длинам волн при разных концентрациях глюкозы**

Для лучшей наглядности был построен еще один график, в котором брались лишь значения максимумов длин волн. Таким образом, была по-

строена кривая зависимости показателей максимумов интенсивностей собственной флуоресценции от концентрации глюкозы (рисунок 4).

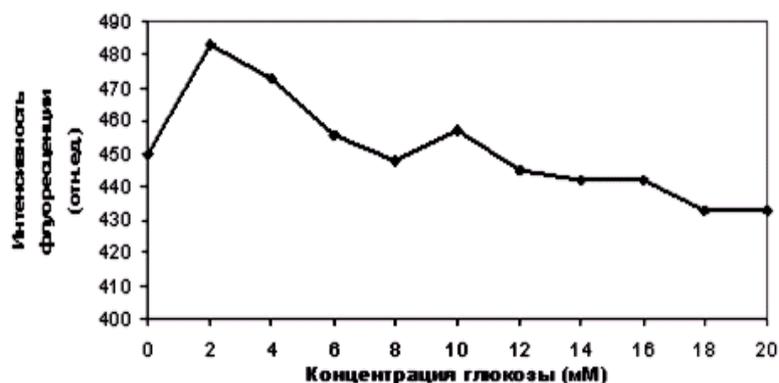


Рисунок 4 — Изменение интенсивности собственной флуоресценции при росте концентрации глюкозы

Как следует из рисунка, при добавлении к раствору белка 2 мМ глюкозы показатель интенсивности собственной флуоресценции вырос на 32 о.е. (относительные единицы), при дальнейшем росте концентрации глюкозы показатель интенсивности собственной флуоресценции снижался. Такие колебания показателя интенсивности собственной флуоресценции сывороточного альбумина указывают однозначно на наличие конформационных переходов в молекуле белка с ростом концентрации глюкозы. Данные конформационные перестройки в молекуле белка при воздействии высоких концентраций сопровождаются снижением показателя интенсивности флуоресценции триптофановых остатков.

Проведенный эксперимент дает основание предположить, что высокие концентрации глюкозы в растворе способны приводить к изменению конформации белка. Снижение показателя интенсивности зондовой флуоресценции БСА с ростом концентрации глюкозы можно частично объяснить изменением конформации белка. При этом белок переходит в такую конформационную форму, которая имеет меньшее количество мест посадки для флуоресцентного зонда.

Таким образом, механизм влияния глюкозы на транспортную функцию белка имеет довольно сложный характер. Так, во-первых, необходимо учитывать влияние глюкозы на конформацию белка, а во-вторых, учитывать конкуренцию за места посадки на альбумине между молекулами глюкозы и флуоресцентным зондом.

По характеру связывающей способности сывороточного альбумина с флуоресцентным зондом можно судить о связывающей способности этого белка с другими лигандами. Большие концентрации глюкозы, вероятно, оказывают аналогичное влияние на связывающую способность веществ (лигандов) с альбумином,

имеющих сходную химическую и пространственную структуру с флуоресцентным зондом.

Сывороточный альбумин неспецифически связывает огромное количество веществ, находящихся в крови, при этом независимо от их химической и пространственной структуры. Одни из веществ присоединяются к его белковой глобуле за счет электростатических связей, возникающих между заряженными участками на молекуле вещества и на белке, другие присоединяются за счет гидрофобных взаимодействий, когда неполярные участки прячутся от полярного растворителя в неполярных «карманах» молекулы белка. Так как эти взаимодействия не носят ковалентный характер, связи эти слабые и молекулы лиганда легко отрываются от мест посадки на белке. При этом устанавливается динамическое равновесие между фракциями связанного с белком и диссоциированного лиганда.

Показатель интенсивности собственной флуоресценции в белке под действием глюкозы снижается, это может указывать на то, что значительного разворачивания белковой глобулы не происходит, возможно, идет обратный процесс — еще более компактное сворачивание белковой глобулы. Вероятно гликозилирование аминокислот, находящихся на поверхности белковой сферы, способствует такому смещению электронных зарядов на белке, что полипептидной цепочке в данных условиях термодинамически более выгодно свернуться в более компактную структуру.

Также нельзя исключать возможность возникновения ассоциатов между молекулами белка за счет возникновения дисульфидной связи между свободными остатками цистеинов на соседних молекулах белка. В литературных источниках вопрос по влиянию гликозилирования на реакционную активность свободных цистеинов досконально не рассмотрен.

Снижение показателя интенсивности собственной флуоресценции БСА под действием глюкозы можно интерпретировать возникновением ассоциатов белка. Так, при их образовании скрываются флуоресцентноактивные аминокислоты белка, и, таким образом, это обстоятельство может обусловить снижение показателя интенсивности собственной флуоресценции белка. Образование ассоциатов может происходить теоретически за счет возникновения нековалентных или ковалентных взаимодействий между гликозилированными аминокислотами, расположенными на поверхностях соседних белковых молекул.

#### **Заключение**

В растворе белка показания интенсивности зондовой флуоресценции снижаются с ростом концентрации глюкозы. Данное изменение зондовой флуоресценции наиболее вероятно обусловлено снижением количества связанного с белком АНС. Так как с ростом концентрации глюкозы снижается показатель связывающей способности альбумина к флуоресцентному зонду, то можно предположить, что с ростом концентрации глюкозы в крови происходит снижение связывающей способности альбумина к другим лигандам.

С ростом концентрации глюкозы показателя интенсивности собственной флуоресценции белка снижается. Связывание глюкозы с белком вызывает изменение перераспределения электронной плотности в белковой глобуле, что способствует внутримолекулярным конформационным перестройкам, на что указывает снижение показателя интенсивности флуоресценции триптофанилов, которая чувствительна к окружению, в котором находятся остатки триптофана. Таким образом, рост концентрации глюкозы в растворе способствует конформационным перестройкам в белковой глобуле, при этом может также нарушаться транспортная функция сывороточного альбумина.

#### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / под ред. Ю. А. Грызунова, Г. Е. Добрецова. — М.: ИРИУС, 1994. — 226 с.
2. Чёгер, С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина / С. И. Чёгер. — Бухарест.: Изд-во Академии СРР, 1975. — 183 с.
3. Луйк, А. И. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов / А. И. Луйк, В. Д. Лукьянчук. — М.: Медицина, 1984. — С. 12–29.
4. Троицкий, Г. В. Дефектные белки: постсинтетическая модификация / Г. В. Троицкий. — Киев.: Наук. думка, 1991. — 229 с.
5. Березов, Т. Т. Биологическая химия: учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1998. — 704 с.
6. Практическая химия белка / под ред. А. Дарбре; пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.

Поступила 24.09.2010

## **ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА**

УДК 61(091):378.661(476.2)

### **МЕДИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ: НАЧАЛО БОЛЬШОГО ПУТИ (К 20-ЛЕТИЮ ОБРАЗОВАНИЯ ГОМЕЛЬСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА)**

**А. Н. Лызиков<sup>1</sup>, А. Л. Калинин<sup>1</sup>, И. В. Тарасюк<sup>2</sup>, И. А. Новикова<sup>1</sup>, Е. М. Бутенкова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

В статье представлены основные сведения об истории открытия, организации работы, подготовке специалистов, перспективах развития медико-диагностического факультета в Гомельском государственном медицинском университете.

**Ключевые слова:** медико-диагностический факультет, история создания, высшее медицинское образование, образовательный стандарт, медико-диагностическое дело.

### **FACULTY OF MEDICAL DIAGNOSTICS: COMMENCEMENT OF GREAT WAY (DEDICATED TO THE 20-YEAR ANNIVERSARY OF THE GOMEL STATE MEDICAL UNIVERSITY)**

**A. N. Lyzikov<sup>1</sup>, A. L. Kalinin<sup>1</sup>, I. V. Tarasyuk<sup>2</sup>, I. A. Novikova<sup>1</sup>, E. M. Butenkova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Gomel State Medical University

<sup>2</sup>Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk

The article contains the main information about the history of foundation, organization of work, training of specialists, perspectives of the development of the Faculty of Medical Diagnostics in the Gomel State Medical University.

**Key words:** Faculty of Medical Diagnostics, history of foundation, higher medical education, educational standard, specialty of Medical Diagnostics.