

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 53.082.56:577.112.824

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРОКСИНИТРИТА В РАСТВОРЕ****Ю. В. Корноушенко¹, В. А. Игнатенко², П. А. Авдеев¹**¹Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины²Гомельский государственный медицинский университет

При действии пероксинитрита на бычий сывороточный альбумин (БСА) происходят процессы, приводящие к деструкции его нативной структуры.

Степень деструкции определяется природой реакций, протекающих под действием пероксинитрита: если субстрат является инертным в химическом отношении, то влияние пероксинитрита опосредуется через гидроксильные радикалы. Если субстрат является активным, то, учитывая короткое время жизни пероксинитрита, последний является непосредственным участником реакции с субстратом.

Учитывая варьирующий объем белковой глобулы в зависимости от рН, ее неоднородную структуру, предполагается наличие одновременного вклада двух механизмов действия пероксинитрита: радикальный и ионный. Однако, учитывая реакционную способность аминокислот, можно предположить преобладание радикального механизма действия пероксинитрита на белковую глобулу.

Таким образом, пероксинитрит оказывает частичное разрушающее действие на бычий сывороточный альбумин, не приводя его к полной денатурации.

Ключевые слова: пероксинитрит, бычий сывороточный альбумин (БСА), зонд АНС, флуоресцентная спектроскопия.

**FLUORESCENCE STUDY OF CONFORMATIONAL CHANGES
OF BOVINE SERUM ALBUMIN UNDER PEROXYNITRITE IN SOLUTION****Yu. V. Kornoushenko¹, V. A. Ignatenko², P. A. Avdeev¹**¹Gomel State University named after F. Skorina²Gomel State Medical University

The effect of peroxyinitrite on bovine serum albumin (BSA) calls forth the processes that lead to the destruction of its native structure.

The degree of the destruction depends on the nature of the reactions occurring under the influence of peroxyinitrite: if the substrate is passive in chemical terms, the effect of peroxyinitrite is mediated through hydroxyl radicals. If the substrate is active, then taking into account the short lifetime of peroxyinitrite, the latter is directly involved in the reaction with the substrate.

Considering the varying amount of protein globule as depending on pH, its heterogeneous structure, one can assume the simultaneous contribution of the two mechanisms of peroxyinitrite effect: both radical and ion. However, taking into account the reactivity of amino acids, one can surmise about the dominance of the peroxyinitrite radical effect on the protein globule.

Thus, peroxyinitrite effects bovine serum albumin in a partially destructive way, which does not lead to its total denaturation.

Key words: peroxyinitrite, bovine serum albumin (BSA), ANS probe, fluorescence spectroscopy.

Введение

Пероксинитрит впервые был замечен более века назад как нестабильный продукт взаимодействия нитритов с пероксидом водорода в кислых средах, обладающий необычно высокой окислительной способностью. Высокую реакционную способность пероксинитрита принято объяснять образованием «гидроксилоподобных» радикалов при гомолизе ONOОН.

Бурный рост интереса к пероксинитриту в последнее время объясняется обнаружением

образования OONO⁻ in vivo и установлением его важной роли в физиологических процессах, химии атмосферы и природных вод.

In vivo пероксинитрит образуется при быстрой рекомбинации монооксида азота (продукта ферментативного окисления L-аргинина) и надпероксид-аниона O₂⁻— обычного продукта клеточного аэробного метаболизма. При повышении содержания монооксида азота и супероксидного радикала антиоксидантная система организма не справляется и возникает сильный

окислитель, способный окислять белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др. орг. молекулы [1].

Большое значение имеет изучение вопроса о том, какой эффект воздействия оказывает пероксинитрит на самый многочисленный (в количественном отношении) белок сыворотки крови — сывороточный альбумин, в частности, на его конформационное состояние, на способность связывать и транспортировать различные эндогенные метаболиты.

Сывороточный альбумин выполняет в организме ряд функций, имеющих важное значение для поддержания гомеостаза внутренней среды всего организма. Их нарушение играет важную роль в патогенезе многих критических состояний организма человека.

Альбумин обратимо связывает и переносит самые разнообразные низкомолекулярные вещества: метаболиты, среди которых жирные кислоты, желчные пигменты, окись азота, холестерин, металлы как постоянной (Zn^{2+} , Ca^{2+}), так и переменной валентности (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+}) и очень многие лекарственные препараты [2]. Альбумин также вносит значительный вклад в защиту организма от вредного действия свободных радикалов.

Основная часть

Пероксинитрит как сильный окислитель и нитрующий агент при взаимодействии с белком вступает в реакции с аминокислотами, такими как тирозин, триптофан, цистеин, метионин и др.

На примере гемоглобина можно охарактеризовать общие черты взаимодействия пероксинитрита с протеинами. Взаимодействие пероксинитрита с окси- или дезоксигемоглобином приводит к образованию метгемоглобина. Образующийся при разрыве пероксинитрита радикал NO_2 вызывает нитрование тирозиновых остатков [3]. В присутствии физиологических концентраций углекислого газа (CO_2) $ONOO$ образует нитрозопероксикарбоксилат анионный аддукт ($ONOO_2$), распад которого также приводит к окислению гемоглобина и образованию нитрующего радикала NO_2 [4].

Металлсодержащие соединения, например, гемоглобин (также, возможно, и сывороточный альбумин, связанный с металлами), могут увеличивать процессы нитрования тирозиновых остатков. Таким образом, металлсодержащие соединения являются катализаторами процесса нитрования [5].

Различное расположение тирозиновых остатков в молекуле гемоглобина, а также в молекуле сывороточного альбумина, при формировании третичной и четвертичной структуры белка и ряд других факторов, возможно, могут способствовать селективности процесса нитрования и вследствие этого приводить к определённым конформационным изменениям в данных белках. Учитывая большее содержание тирозиновых остатков в молекуле сывороточного альбумина (человека —

17 остатков) по сравнению с гемоглобином (каждая цепь содержит по 3 тирозиновых остатка), можно сделать предположение, что нитрование тирозиновых остатков альбумина имеет доминирующее влияние на конформацию данного белка по сравнению с модификацией других аминокислотных остатков под действием пероксинитрита [6]. Таким образом, оказывая влияние на конформацию альбумина, пероксинитрит способен изменять функции, выполняемые альбумином в организме: связывающая, транспортная и т. д.

Цель работы

Исследование конформационных изменений альбумина под действием пероксинитрита в растворе.

Материалы и методы

Объектом исследования являлся бычий сывороточный альбумин фирмы «Sigma-Aldrich».

Предметом исследования явилось изучение конформационных изменений и структуры альбумина под действием пероксинитрита.

Флюоресценцию растворов альбумина исследовали на спектрофлуориметре марки «Cary Eclipse».

Концентрацию БСА для экспериментов взяли равной 10^{-5} моль/л, или 0,66 г/л. Она является оптимальной, т. е. флуоресценция белка связана прямопропорциональной зависимостью с концентрацией. Для нахождения данной концентрации строили калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка. На графике нашли отрезок, характеризующийся прямой пропорциональной зависимостью и, поделив его пополам, получили значение оптимальной концентрации альбумина.

Экстинцию для собственной флуоресценции, обусловленной, в основном, триптофанилами, устанавливали на приборе при длине волны 280, 290 нм, эмиссию — при длине волны 350 нм.

Помимо собственной флуоресценции белка исследовали зондовую флуоресценцию. В качестве зонда использовали N-фенил-1-амино-8-сульфонафталин (АНС). Количество зонда, необходимое для реакции с альбумином, рассчитывали, исходя из того, что количество центров на альбумине для АНС равно 5–6. Поэтому концентрацию зонда для эксперимента взяли равной 6×10^{-5} моль/л.

Данные зондовой флуоресценции наряду с данными о собственной флуоресценции могут дать дополнительную информацию о конформационных изменениях белка, т. к. зондовая флуоресценция более чувствительна к изменениям структуры белка, чем собственная флуоресценция. Экстинцию зондовой флуоресценции устанавливали при длинах волн 280, 290 и 320 нм, эмиссию — при длине волны 450 нм.

Изучение действия пероксинитрита на конформацию сывороточного альбумина складывалось из нескольких этапов:

1. Титрование АНС-ом центров посадки для лигандов на БСА.

2. Получение пероксинитрита путем смешивания закисленной с помощью 0,7н HCl 0,65 моль/л перекиси водорода с 0,4 моль/л нитритом натрия. Затем полученную смесь мгновенно гасили посредством 0,9н NaOH. Перед получением пероксинитрита предварительно охлаждали реактивы до минусовой температуры. Концентрацию образовавшегося пероксинитрита в растворе определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 302 нм ($\epsilon_{302 \text{ нм}} = 1679 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Из-за нестабильности пероксинитрита перед каждым экспериментом готовили новый его раствор.

3. Влияние постоянной концентрации пероксинитрита на БСА с добавлением различных концентраций АНС.

4. Влияние пероксинитрита на собственную флуоресценцию БСА.

5. Влияние пероксинитрита на собственную и зондовую флуоресценцию БСА в присутствии 70 % этилового спирта.

6. Влияние различных концентраций пероксинитрита на собственную и зондовую флуоресценцию БСА в кислой, нейтральной и щелочной среде. Для создания среды использовали три различных буфера: фосфатный с рН 7,43, трис-буфер с рН 9,08, ацетатный с рН 4,54.

Для приготовления буферов использовали реактивы ч.д.а. Каждый эксперимент проводили трижды, столько же раз измеряли флуоресценцию. Графики строили по средним из трех экспериментов. Неопределенность результатов эксперимента — в пределах 5 %.

Результаты и их обсуждение

Проводили титрование центров посадки зонда АНС на бычьем сывороточном альбумине. Результаты представлены на рисунке 1.

В ходе титрования использовали концентрации АНС $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ моль/л в различных объемах. На рисунке 1 видно, что оптимальной концентрацией АНС, связанного с белком, при которой наблюдается максимальное свечение, соответствует концентрации 10^{-6} моль/л. При концентрациях больших или меньших оптимальной интенсивность флуоресценции невысокая, что объясняется в первом случае зондовой конкуренцией, а в другом — не полностью заполненными центрами посадки для АНС на белке.

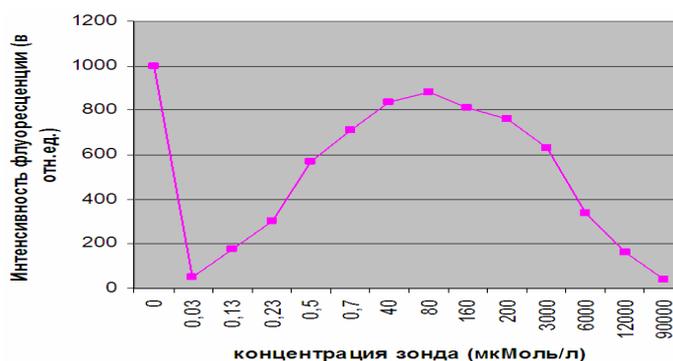


Рисунок 1 — Значения максимумов интенсивности зондовой флуоресценции при титровании БСА зондом АНС

Вторым этапом работы было изучение влияния пероксинитрита, на бычий сывороточный альбумин с добавлением различных концентраций АНС. Результаты, полученные в

ходе данного исследования, отражены на рисунке 2. Пероксинитрит получили в концентрации $6,2 \times 10^{-8}$ моль/л, т. е. довольно низкая концентрация.

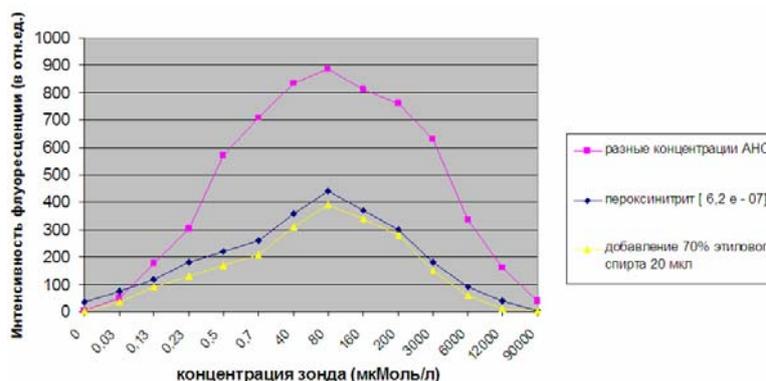


Рисунок 2 — Значения максимумов интенсивности флуоресценции при действии пероксинитрита на БСА с добавлением различных концентраций АНС в отсутствии и в присутствии этилового спирта (70 %)

На рисунке 2 видно, что сам характер хода кривых одинаковый. Однако при добавлении пероксинитрита к бычьему сывороточному альбумину происходит падение интенсивности зондовой флуоресценции. Этот факт свидетельствует об окислении пероксинитритом аминокислотных остатков белка, таких как тирозин, фенилаланин (окисление фенольных групп), триптофан, цистеин, метионин либо радикальном влиянии пероксинитрита на АНС, либо на центры его посадки.

Учитывая варьирующий в зависимости от pH объем белковой глобулы, ее неоднородную структуру, предполагается наличие одновременного вклада двух механизмов действия пероксинитрита: радикальный и ионный. Однако, зная реакционную способность аминокислот, можно говорить о преобладании радикального механизма действия пероксинитрита на белковую глобулу.

При добавлении этилового спирта, чтобы подавить возникновение гидроксильных радикалов и тем самым разграничить действие в деструкцию сывороточного альбумина пероксинитрита и гидроксильных радикалов, интенсивность зондовой флуоресценции, как можно видеть из графика, практически не снижалась.

Этот факт свидетельствует именно о вкладе пероксинитрита в деструкцию сывороточного альбумина, а не гидроксильных радикалов.

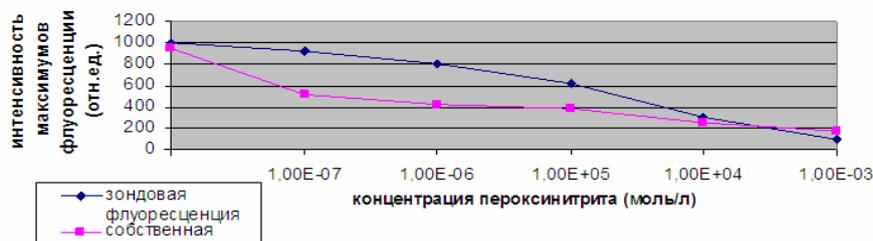


Рисунок 3 — Значения максимумов интенсивности собственной и зондовой флуоресценции в зависимости от концентрации пероксинитрита в кислой среде (pH = 4,54)

В нейтральной области pH происходят конформационные переходы, сопровождающиеся изменением микроокружения аминокислотных остатков поверхностного триптофана, тирозилов, гистидилов.

В нейтральной среде пероксинитрит также не стабилен, как и в кислой. Поэтому деструкция белка должна происходить как и в кислой среде: за счет гидроксильных радикалов либо за счет нитрования NO₂-радикалами. Однако, учитывая большую стабильность пероксинитрита в нейтральной области pH, нежели в кислой, было допущено, что в нейтральной среде доля процессов радикального нитрования ароматических аминокислот, в частности, тирозина выше, чем в кислой среде.

Этот факт можно объяснить данными, представленными на графиках, отражающих неоднозначный ход кривой по сравнению с кислой средой, где основную роль играет гидроксильный радикал. Предполагается вклад обо-

их механизмов действия пероксинитрита на БСА: ионный и радикальное нитрование.

Вклад радикального нитрования в деструкцию белка вносит значительные коррективы при интерпретации спектров флуоресценции альбумина в нейтральных средах, что отражено на рисунке 4.

Учитывая, что процесс нитрования селективен и в альбумине около 17 аминокислотных остатков тирозинила, такое селективное нитрование может способствовать определенной конформации альбумина либо вторичной структуре, которое, по-видимому, и приводит к таким показателям спектров флуоресценции. Таким образом, видно, что падение зондовой и собственной флуоресценции не дозависимо. Можно предположить, что в нейтральных средах в зависимости от концентрации пероксинитрита изменяется степень селективности пероксинитрита к нитрованию альбумина.

В отличие от влияния пероксинитрита свободные радикалы действуют намного более агрессивно, нежели пероксинитрит. В кислой среде, как показано на рисунке 3, происходит увеличение объема белковой глобулы, в результате чего может возрастать «просвет» белковой глобулы и увеличение доступности ее аминокислотных остатков для пероксинитрита. Однако, учитывая неустойчивость пероксинитрита в кислых средах, действие последнего должно опосредоваться через влияние гидроксильных радикалов, реакционная способность которых превосходит реакционную способность самого пероксинитрита, либо за счет нитрования NO₂-радикалами.

За счет того, что в кислой среде основную роль играет гидроксильный радикал, видно, что деструкция белка выражена более четко и дозависимо в отношении зондовой флуоресценции. Значения максимумов интенсивности собственной флуоресценции более низкие по сравнению со значениями для зондовой флуоресценции, это может говорить о нарушении триптофанового микроокружения или разрушении самого триптофанового центра.

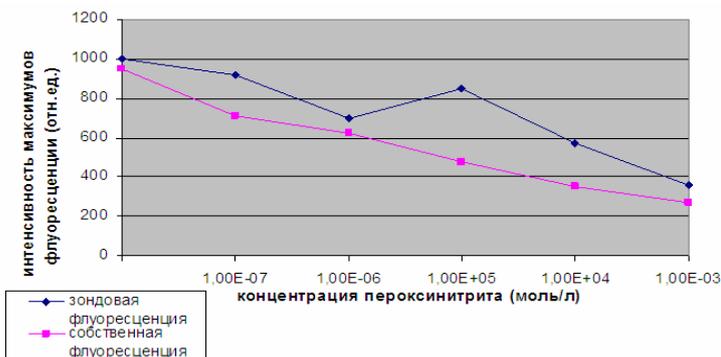


Рисунок 4 — Значения максимумов интенсивности собственной и зондовой флуоресценции в зависимости от концентрации пероксинитрита в нейтральной среде (рН = 7,43)

В щелочной области рН происходит конформационный переход, сопровождающий повышение доступности имидазольных остатков, составляющих аминокислоту гистидин.

В щелочной среде пероксинитрит более стабилен и поэтому деструкция альбумина происходит за счет непосредственного окисления пероксинитритом.

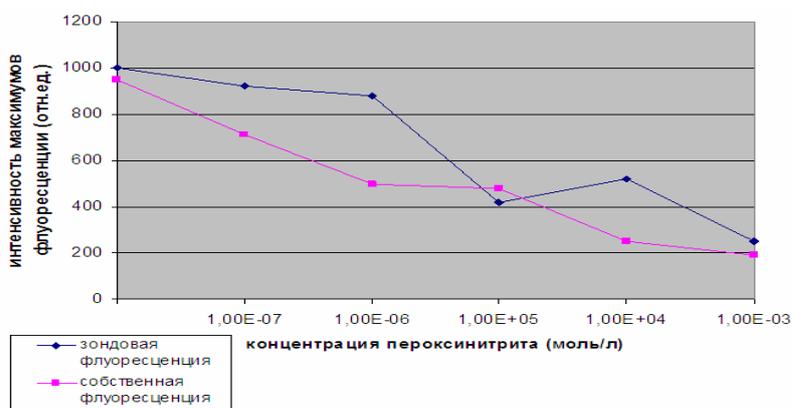


Рисунок 5 — Значения максимумов интенсивности собственной и зондовой флуоресценции в зависимости от концентрации пероксинитрита в кислой среде (рН = 9,08)

На рисунке 5 видно, что интенсивность зондовой и собственной флуоресценции имеет сложный характер. Это связано с неодинаковым вкладом окисления различных аминокислотных остатков белка. По зондовой флуоресценции видно, что даже при высоких концентрациях пероксинитрита происходит сохранение некоторых центров для посадки зонда, что вносит свой вклад в зондовую флуоресценцию. Что касается собственной флуоресценции, то видно, что под действием пероксинитрита, возможно, происходит окисление самого триптофанила либо его микроокружения, представленного гидрофобными аминокислотами.

Заключение

При действии пероксинитрита на БСА происходят процессы, приводящие к деструкции его нативной структуры.

Степень деструкции определяется природой реакций, протекающих под действием пероксинитрита: если субстрат является инертным в химическом отношении, то влияние пе-

роксинитрита опосредуется через гидроксильные радикалы. Если субстрат является активным, то, учитывая короткое время жизни пероксинитрита, последний является непосредственным участником реакции с субстратом.

Учитывая варьирующий объём белковой глобулы в зависимости от рН, её неоднородную структуру, предполагается наличие одновременного вклада двух механизмов действия пероксинитрита: радикальный и ионный. Однако, учитывая реакционную способность аминокислот, можно предположить преобладание радикального механизма действия пероксинитрита на белковую глобулу.

Таким образом, пероксинитрит оказывает частичное разрушающее действие на бычий сывороточный альбумин, не приводя его к полной денатурации.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Зинчук, В. В. Действие пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду in vitro / В. В. Зинчук // Биофизика. — 2006. — Т. 51, Вып. 1. — С. 32–38.

2. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / под ред. Ю. А. Грвзунова, Г. Е. Добрецова. — М.: ИРИУС, 1994. — 226 с.
3. Мушкабаров, Н. Н. Молекулярная биология: учеб. пособие для студентов мед. вузов / Н. Н. Мушкабаров, С. Л. Кузнецов. — М.: Медицинское информационное агентство, 2007. — 536 с.
4. Луйк, А. И. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов / А. И. Луйк, В. Д. Лукьянчук. — М.: Медицина, 1984. — С. 12–29.

5. Добрецов, Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеточных мембран и липопротеинов / Г. Е. Добрецов. — М.: Наука, 1989. — 277 с.

6. Миллер, Ю. И. Использование флуоресцентного зонда в оценке связывающей способности сывороточного альбумина человека при печеночной недостаточности / Ю. И. Миллер // Лаб. дело. — 1989. — № 7. — С. 20–23.

Поступила 18.10.2010

ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА

УДК 613.32.614.77

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА РЕКИ АНГАРЫ (ИРКУТСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Е. В. Анганова¹, А. В. Духанина², Е. Д. Савилов³

¹Иркутский институт усовершенствования врачей

²Институт эпидемиологии и микробиологии Российской Академии медицинских наук

³Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, г. Иркутск

В статье представлены результаты изучения микробного сообщества крупнейшего источника водоснабжения Восточной Сибири — реки Ангары. Установлено, что ее микробиоценоз представлен грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами. Среди грамотрицательных условно-патогенных микроорганизмов выявлены бактерии семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* и *Alcaligenaceae*. Наиболее часто встречаются (88,7 %) и представлены самым широким спектром (17 видов) бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. В районе городов Иркутска и Ангарска, где на Ангару оказывается существенный антропогенный прессинг, отмечались существенные преобразования сообществ микроорганизмов (увеличение доли грамотрицательных бактерий, изменение их видового разнообразия), что свидетельствует о нарушении нормального экологического состояния водоема на данном участке. В микробном сообществе истока реки преобладает грамположительная аутохтонная микрофлора и отмечается узкий спектр условно-патогенных грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: водные экосистемы, микробные сообщества, условно-патогенные микроорганизмы.

DESCRIPTION OF THE MICROBIAL COMMUNITY IN THE RIVER OF ANGARA (IRKUTSK REGION)

E. V. Anganova¹, A. V. Duhanina², E. D. Savilov³

¹Irkutsk Institute of Advanced Medical Studies

²Institute for Epidemiology and Microbiology of the Russian Academy of Medical Sciences,

³Research Centre for the problems of family health and human reproduction of the SB RAMS, Irkutsk

The article presents the results of the investigation of the microbial community in the largest water supply source in Eastern Siberia — the river of Angara. It has been established that grampositive and gramnegative microorganisms constitute the river's microbiocenosis. The bacteria of the families *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* and *Alcaligenaceae* have been detected among the gramnegative conditional-pathogenic microorganisms. The bacteria of *Enterobacteriaceae* family are the most prevalent (88,7 %) and have the widest spectrum (17 species). The remarkable transformations of the microorganism communities (the increase of gramnegative bacteria share, change of their specific variety) were observed in the areas of the cities of Irkutsk and Angarsk, where the Angara was characterized by the considerable anthropogenous pressure. This fact testifies to the infringement of a normal ecological state of the water body on the given area. The microbial community of the river's head is characterized by the prevalence of grampositive autochthonous microflora and narrow spectrum of conditional-pathogenic gramnegative bacteria.

Key words: water ecosystems, microbial communities, conditional-pathogenic microorganisms

Введение

Микробные ассоциации воды открытых водоемов представлены микроорганизмами 2 экологически различных групп: аутохтонная грамположительная микрофлора и аллохтонные

граммотрицательные микроорганизмы [1]. Грамотрицательные условно-патогенные микроорганизмы, среди которых следует отметить энтеробактеры, клебсиеллы и др., свидетельствуют о поступлении в водоем сточных вод. В усло-