

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ГЛОБУЛ СЫВОРОТОЧНОГО  
АЛЬБУМИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО АГЕНТА ПО  
ДАНЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА**

Выполнил студент 405 группы:  
Ганиев Алексей Сергеевич

\_\_\_\_\_   
подпись студента

Научный руководитель:  
кандидат физ.-мат. наук, старший преподаватель  
Власова Ирина Михайловна

\_\_\_\_\_   
подпись научного руководителя

Допущен к защите «\_\_» «\_\_\_\_\_» 2021 г.

Зав. кафедрой

профессор Салецкий А.М.

\_\_\_\_\_   
подпись зав.кафедрой

Москва  
2021

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	3
<b>Глава 1. Конформационная подвижность белков и их структурные изменения по данным флуоресцентного анализа (литературный обзор)</b> ..	4
§1.1. Уровни структурной организации белков. Бычий сывороточный альбумин (БСА).....	4
§1.2. Пространственная конфигурация и переходы «глобула – клубок» в полимерных макромолекулах белков.....	14
§1.3. Различные типы взаимодействий в макромолекулах белков.....	19
§1.4. Окислительный стресс и его влияние на структуру и конформационную подвижность белков. Медицинский аспект.....	23
§1.5. Физические основы флуоресцентной спектроскопии.....	32
§1.6. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях конформационных состояний белков.....	37
<b>Глава 2. Методическая часть экспериментов</b> .....	39
§2.1. Приготовление растворов БСА и перекиси водорода для анализа тушения триптофановой флуоресценции белка.....	39
§2.2. Приготовление растворов БСА и перекиси водорода с добавлением флуоресцентного зонда для анализа флуоресценции зонда.....	39
§2.3. Методика экспериментов для исследования тушения триптофановой флуоресценции БСА в растворах с перекисью водорода.....	39
§2.4. Методика экспериментов для исследования флуоресценции зонда в растворах БСА и перекиси водорода.....	40
<b>Глава 3. Моделирование молекулярной динамики глобул бычьего сывороточного альбумина при воздействии окислительного агента по данным флуоресцентного анализа</b> .....	41
<b>Основные результаты и выводы</b> .....	48
<b>Список цитируемой литературы</b> .....	49

## Введение

Белки образуют основу клеток и тканей организмов на нашей планете Земля. Функции белков разнообразны, они принимают участие как в обмене веществ, так и в транспорте лекарств, в росте организмов, их размножении, и даже в процессах мышления.

Одним из белком плазмы крови является сывороточный альбумин. Сывороточный альбумин синтезируется в печени и составляет большую часть среди всех сывороточных белков крови. Основной функцией альбумина является транспортная функция. Также бычий сывороточных альбумин (далее – БСА) часто используется в качестве стандарта в различных методах количественного расчета белков и в качестве стандарта молекулярной массы белков (иногда говорят «маркера») в электрофорезе белков.

Целью данной работы является исследование молекулярной динамики «глобул» бычьего сывороточного альбумина (БСА) методами «флуоресцентного» анализа при «окислительном» повреждении молекул БСА перекисью водорода.

В рамках данной цели были поставлены такие задачи:

во-первых, анализ собственной белковой флуоресценции в растворах «окислительного» агента – перекиси водорода – в широком диапазоне значений рН, во-вторых, анализ «флуоресценции» молекулярного «зонда» эозина в растворах БСА с перекисью водорода при различных значениях рН, в-третьих, анализ «глобул» молекулы БСА при «окислительном» повреждении перекисью водорода в зависимости от значения рН.

Полученные в работе результаты представляют интерес для понимания вклада «окислительного стресса» в возникновение и развитие ряда заболеваний, поскольку «окислительный стресс» сейчас в литературе рассматривается в качестве важного патогенетического звена многих заболеваний.

## **Глава 1. Конформационная подвижность белков и их структурные изменения по данным флуоресцентного анализа (литературный обзор)**

### ***§1.1. Уровни структурной организации белков. Бычий сывороточный альбумин (БСА)***

Белки являются высокомолекулярными полипептидами. Простые белки содержат только аминокислоты, а сложные— еще и неаминокислотные компоненты: гем, производные витаминов, липидные или углеводные компоненты.

Белки играют центральную роль в жизни клеток и клеточных структур. Анализ содержания в крови определенных белков и ферментов часто используется в диагностических целях. Анализ содержания в плазме липопротеинов и иммуноглобулинов обычно используется при диагностике специфических типов гиперлипидемии и иммунных нарушений.

Универсальной системы, на настоящее время, классификации белков не существует. Имеется пока несколько общеупотребительных систем классификации [1-4].

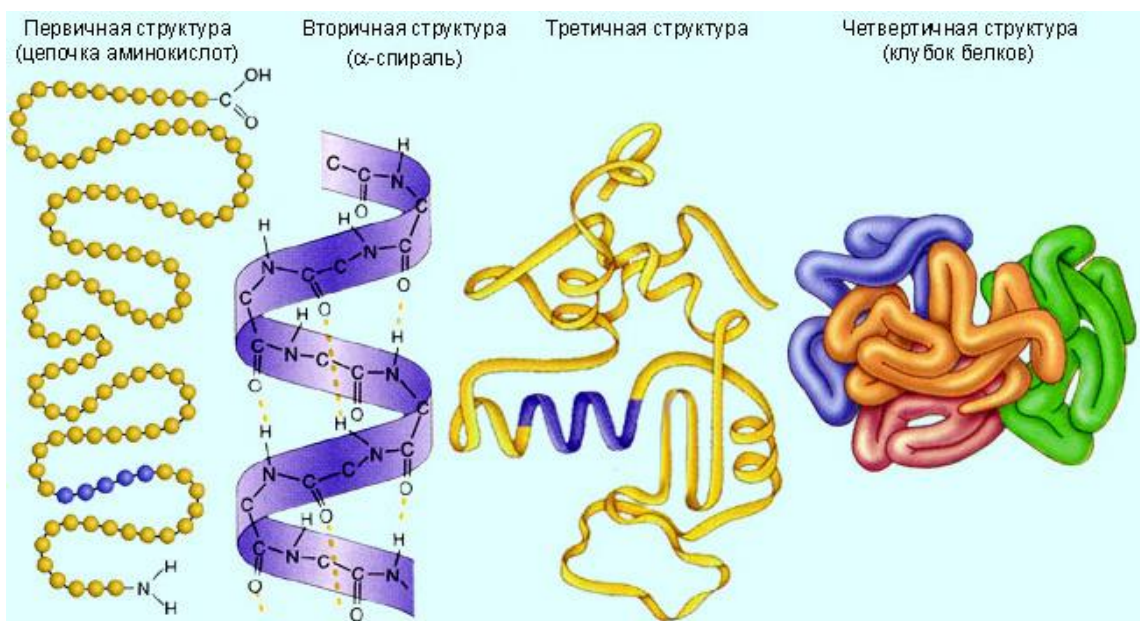
Перечислим основные ***уровни структурной организации белков:***

#### ***1) Первичная структура***

Под первичной структурой понимается последовательность аминокислот в полипептидной цепи (или цепях) и положение дисульфидных связей, если они имеются.

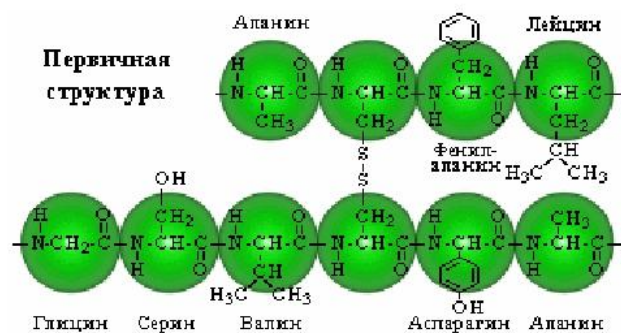
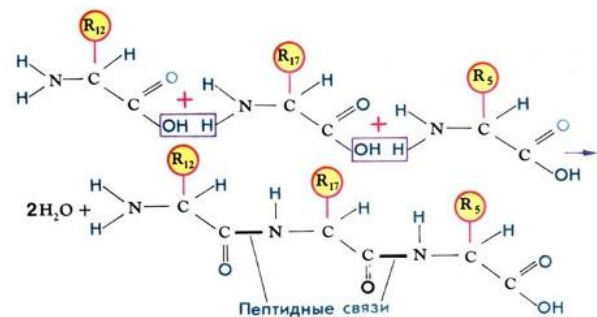
#### ***2) Вторичная структура***

На этом структурном уровне описываются стерические взаимосвязи между расположенными близко друг к другу вдоль цепи аминокислотами. Вторичная структура может быть регулярной ( $\alpha$ -спираль, складчатый  $\beta$ -слой) или не обнаруживать никаких признаков регулярности.

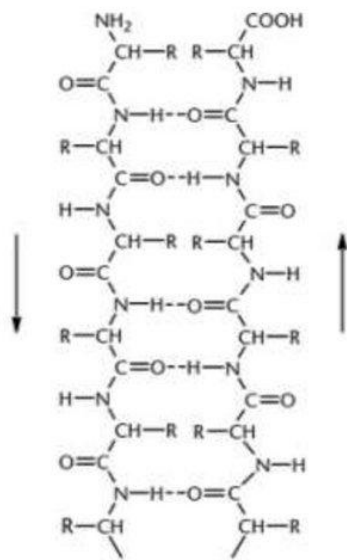


# Первичная структура белков

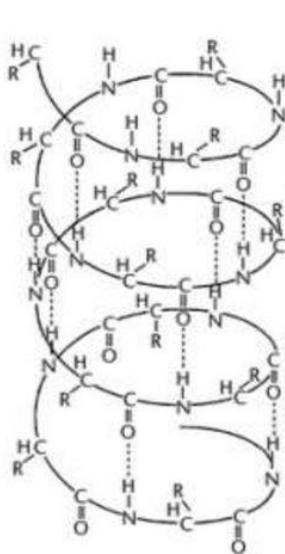
- **Первичная структура** - определенная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Связи между аминокислотами **ковалентные**, а следовательно очень **прочные**



## Вторичная структура белка



**β складчатая структура**



**α спираль**

Стабилизируется  
только  
водородными  
связями

## Третичная структура белка



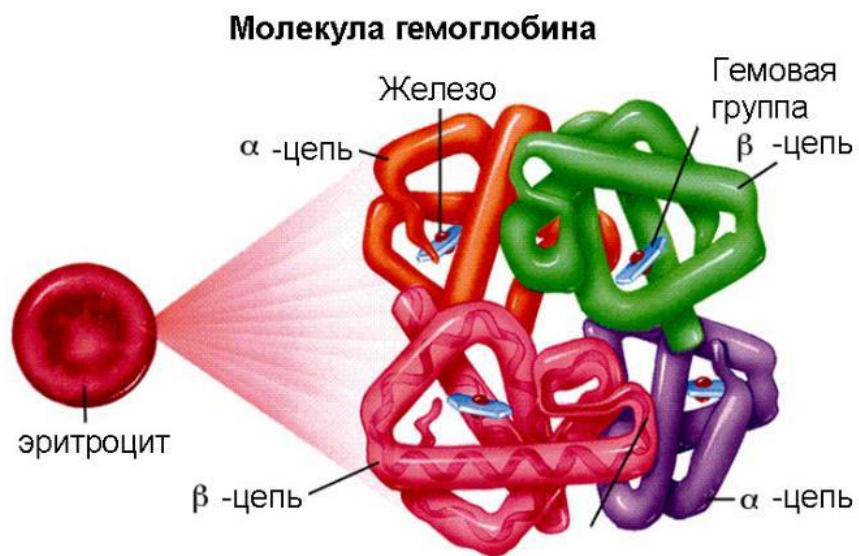
Нить аминокислот свёртывается и образует клубок или фибриллу, специфичную для каждого белка.

### Связи:

- водородные
- дисульфидные
- гидрофобное взаимодействие



# Четвертичная структура



### **3) Третичная структура**

Общее расположение, взаимную укладку различных областей, доменов и отдельных аминокислотных остатков одиночной полипептидной цепи называют третичной структурой данного белка. Под третичной структурой понимают стерические взаимосвязи между аминокислотными остатками, далеко отстоящими друг от друга по цепи.

### **4) Четвертичная структура**

Если белки состоят из двух и более полипептидных цепей, связанных между собой нековалентными связями, то говорят, что они обладают четвертичной структурой. Такие агрегаты стабилизируются водородными связями и электростатическими взаимодействиями между остатками. Подобные белки называют олигомерами, а составляющие их индивидуальные полипептидные цепи — протомерами, мономерами или субъединицами.

***Рассмотрим отдельно свойства и строение такого белка, как бычий сывороточный альбумин [1-4].***

Бычий сывороточный альбумин – глобулярный белок массой 66 кДа, содержит 585 аминокислотных остатков и составляет примерно 60% белка плазмы крови. Сывороточный альбумин – один из основных белков плазмы крови. Изoeлектрическая точка БСА находится в интервале рН вблизи 4,9. При нейтральных рН кристаллическая структура белка имеет сердцевидную форму. Трехмерная структура БСА состоит из трех гомологичных доменов (I, II, III), каждый из которых сформирован шестью спиральями и подразделяется на 2 субдомена.

БСА содержит 17 дисульфидных связей, которые придают жесткость каждому субдомену, но позволяют значительные изменения формы и размера белка при разных условиях. При нейтральных рН дисульфидные связи погружены вглубь молекулы белка и не экспонированы в растворитель.

## СОСТАВ ПЛАЗМЫ КРОВИ





*Рис. Бычий  
сывороточный альбумин*



*Рис. Сывороточный альбумин человека*

БСА содержит два остатка триптофана (Trp), находящиеся в двух разных доменах: Trp-134, расположенный вблизи поверхности белка, но погруженный в гидрофобный «карман» домена I, и Trp-214, расположенный во внутренней части домена II. Последовательность БСА на 76% гомологична последовательности человеческого сывороточного альбумина.

Одной из наиболее важных функций БСА, как и других сывороточных альбуминов, является транспорт свободных жирных кислот. Сывороточный альбумин играет ключевую роль в транспорте большого числа метаболитов, билирубина, гормонов, лекарств, металлов.

БСА способен подвергаться обратимой конформационной перестройке при изменении значений pH. Всего идентифицированы 5 конформеров БСА в разных диапазонах pH. Средняя молярная масса нативного БСА при комнатной температуре составляет  $6,6 \times 10^4$  г/моль, гидродинамический диаметр равен примерно 7 нм.

При нагревании  $\alpha$ -спиральная структура БСА разрушается и образуются складчатые слои и участки хаотической укладки.

### ***§1.2. Пространственная конфигурация и переходы «глобула – клубок» в полимерных макромолекулах белков***

Хорошо известно, что основой структурной организации всего живого на Земле являются макромолекулы, и среди них прежде всего важнейшие биополимеры. Это – белки и нуклеиновые кислоты. Особенностью полимерных молекул является наличие большого числа однотипных звеньев (то есть мономеров), которые связаны в цепь. Тепловое движение образующих полимерную цепь атомов и атомных групп, а также их повороты и вращение вокруг единичных связей приводят, как нетрудно догадаться, к большому числу степеней свободы молекулы. Это дает возможность рассматривать макромолекулы как макроскопическую систему. Статистический характер поведения такой системы позволяет говорить о

средних значений таких параметров, как размеры, форма, степень свёрнутости макромолекулы и так далее. Вместе с тем существующие между атомами химические связи и взаимодействия как ближнего, так и дальнего порядка приводят, естественно, к определённым ограничениям на число возможных конфигураций макромолекул.

Изменение конформации биополимеров, происходящее при процессах клеточного метаболизма, также меняют внутримолекулярную организацию биополимеров.

Таким образом, своеобразие биологической макромолекулы как физического объекта заключается в тесном сочетании статистических и механических особенностей её поведения.

Все взаимодействия между атомами независимо от их конкретной физической природы при формировании различных макромолекулярных структур и переходов между ними можно разделить на два типа. Это - взаимодействия ближнего порядка между атомами соседних звеньев и дальние взаимодействия между атомами, которые хотя и отстоят относительно далеко друг от друга, но могут сблизиться в результате изгибания цепи.

Следуя работам [5-6] посмотрим на однородную последовательность одинаковых звеньев вдоль единой цепи. Геометрические размеры полимера можно задавать среднеквадратичным расстоянием  $h^2$  между его концами. Далее внутреннюю пространственную структуру можно задавать пространственным распределением плотности звеньев  $n(x)$ . Вследствие дальних (иногда говорят объёмных) взаимодействий плотность числа звеньев молекулы может меняться от точки к точке. Если при этом в макромолекуле полностью отсутствуют всякие объёмные взаимодействия, то, как следствие, она не имеет достоверной пространственной структуры. В таком состоянии флуктуация плотности является величиной порядка самой плотности. Возникает состояние, которое носит название «клубок». Радиус корреляции  $\xi$  здесь того же порядка, что размеры макромолекулы

$\xi \sim R$ , где  $R \sim lN^{1/2}$ .

Если есть объёмные взаимодействия, то может возникать состояние, в котором флуктуации плотности малы по сравнению с самой плотностью. Такое плотное образование называется «глобула». При этом радиус корреляции флуктуаций плотности много меньше размеров макромолекулы:

$\xi \ll R$ , причём  $R \sim N^{1/3}$ .

«Глобула» в отличие от «клубка», как нетрудно догадаться, более компактна. Для простоты считают, что сердцевина большой «глобулы» имеет постоянную концентрацией звеньев  $n_0$ .

Когда же возникают «клубок» и «глобула»? Из-за дальних взаимодействий сблизившиеся участки молекулы могут либо притягиваться, либо отталкиваться друг от друга. По статистическим законам повышение температуры приводит вообще говоря к увеличению отталкивания между мономерами, а понижение температуры – к взаимному притяжению. Таким образом есть температура, при которой отталкивание мономеров уравновешивается их взаимным притяжением. Эта температура называется  $\Theta$ -температурой. Ясно, что при такой температуре объёмные взаимодействия отсутствуют. При повышении температуры, то есть при  $T > \Theta$  из-за увеличения сил отталкивания размеры клубка возрастают

$R > lN^{1/2}$ .

Таким образом, можно написать, что

$R^2 = \alpha(R^2)_0$ ,

где  $(R^2)_0$  вычисляется без учёта дальних объёмных взаимодействий;  $\alpha$  – коэффициент набухания макромолекулы;  $\alpha > 1$  в области  $T > \Theta$  и  $\alpha = 1$  при  $T = \Theta$ .

Если к макромолекуле добавить растворитель, то в хороших растворителях притяжение атомов цепи и растворителя больше, чем между атомами цепи, что эквивалентно увеличению их взаимного отталкивания (область  $T > \Theta$ ;  $\alpha > 1$ ). И наоборот, в плохих растворителях взаимное притяжение звеньев полимера больше, чем их притяжение к молекулам



растворителя (область  $T < \Theta$ ;  $\alpha < 1$ ). В области  $T < \Theta$  в объёмном взаимодействии основную роль играют силы притяжения. Соответственно к может возникать эффект конденсации «клубка» в «глобулу».

Можно рассматривать полимерную цепь без объёмных взаимодействий, но во внешнем сжимающем поле  $\phi(x)$ . Поле это может рассматриваться как самосогласованное поле, образованное всеми элементами системы. Этот метод часто применяется в статистической физике. Оказывается, что в таком методе «глобула» может приобретать дискретный спектр свободной энергии.

В реальных макромолекулах объёмные взаимодействия в отсутствие внешнего поля сами создают самосогласованно поле, приводящее к образованию «глобулы».

Изменение температуры среды приводит к изменению размеров макромолекулы. То есть изменяется средней плотности числа звеньев. Следовательно изменяется энергия их взаимодействия. Тогда ясно, что вклад сил притяжения и отталкивания в свободную энергию взаимодействия ( $F$ ) звеньев приобретает зависимость от числа  $n$ . При малом  $n$  свободная энергия взаимодействия может быть разложена в ряд по степеням  $n$ :

$$F = Vk_B T (Bn^2 + Cn^3 + \dots),$$

здесь  $V$  – объём системы;  $B$  и  $C$  – некоторые коэффициенты разложения, иногда называемые вириальными коэффициентами. Легко видеть что, первое слагаемое в правой части равенства, которое пропорционально  $n^2$ , описывает вклад парных столкновений звеньев. Тогда второе – даёт вклад тройных столкновений и так далее и тому подобное.

При условии, что энергия притяжения при столкновениях велика по сравнению с  $k_B T$ , силы притяжения сталкивающихся частиц играют наибольшую роль. Как следствие они дают отрицательный вклад в общую энергию системы -  $B < 0$ . При этом конечно макромолекула сжимается относительно размеров идеального «клубка».

Другая картина наблюдается, когда энергия притяжения меньше  $k_B T$ , и силы отталкивания дают в свободную энергию положительный вклад -  $B > 0$ . Это вызывает набухание белка.

В отсутствие объёмных взаимодействий при  $\Theta$ -температуре имеет место  $B(\Theta) = 0$ . Тогда при плохом растворителе  $B < 0$ . А в случае хорошего растворителя соответственно  $B > 0$ .

Если  $F$  перестаёт иметь минимум при отличных от нуля значениях  $n$ , то «глобула» распадается. Происходит переход «глобула – клубок». Точке перехода соответствует условие  $F = 0$ .

Переходы между состояниями «клубка и глобулы» являются переходами между разными фазами. При этом меняется агрегатное состояние молекулы.

Хорошо известно из физики, что фазовые переходы первого рода происходят между двумя состояниями, каждое из которых стабильно по одну сторону от точки перехода и метастабильно по другую сторону. Тогда переход между ними при изменении внешнего параметра (например температуры) сопровождается тепловым эффектом (например, плавление льда и образование жидкой водной фазы).

Фазовые переходы второго рода происходят без тепловых эффектов. В области перехода существует лишь один минимум свободной энергии.

Тогда как при фазовых переходах первого рода энтропия и внутренняя энергия меняются скачком вследствие затраты конечной теплоты перехода и конечного изменения удельного объёма системы, при переходах второго рода теплоёмкость меняется скачком, энтропия и внутренняя энергия – непрерывно, а удельный объём системы не испытывает скачка. При этом структура системы меняется непрерывно, а симметрия системы меняется скачком.

Фазовые переходы определены строго для случая, когда число частиц в системе  $N \rightarrow \infty$ . В реальных полимерах, где  $N$  – большое, но конечное число, существует конечная ширина температурного перехода  $\Delta T$ .

Конформационный переход является фазовым, если его ширина стремится к нулю:  $\Delta T \rightarrow 0$  при  $N \rightarrow \infty$ .

Возможны, однако, и другие случаи, когда температура перехода «клубок – глобула» не совпадает с  $\Theta$ -условиями.

В литературе показано [5-6], что в случае жёсткой цепи переход «клубок – глобула» осуществляется в виде фазового перехода первого рода, хотя и с малой теплотой перехода. Конечный скачок плотности наблюдается несколько ниже  $\Theta$ -точки. Для гибких цепей переход осуществляется в виде плавный переход второго рода.

### ***§1.3. Различные типы взаимодействий в макромолекулах белков***

Первичная структура макромолекулы, то есть последовательность аминокислотных звеньев в цепи белка, определяется химическими или валентными взаимодействиями. Кроме этого, между молекулами действуют слабые невалентные силы, которые дают как притяжение, так и отталкивание.

На малых расстояниях из-за отталкивания молекул при взаимном влиянии их электронных оболочек преобладают силы отталкивания, а на больших расстояниях превалирует притяжение.

Существуют различные типы взаимодействий, от которых в основном зависит вторичная структура макромолекул. Рассмотрим следуя работам [5, 6] классификацию этих взаимодействий и их различающиеся вклады в структуру белковых макромолекул

#### ***1) Взаимодействия Ван-дер-Ваальса***

Силы Ван-дер-Ваальса хорошо известны в физике. Они играют большую роль в образовании конденсированных жидких и твёрдых состояний. Ими определяются взаимодействия в газах и возникающие отклонения от законов идеальных газов.

Биологические макромолекулы можно трактовать как конденсированную систему, состояние которой определяется слабыми невалентными взаимодействиями Ван-дер-Ваальса. Они дают основной вклад в стабильность макромолекулы.

Обычно значение энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий берут за 4-8 кДж/моль. Заметим при этом, что в энергия ковалентных связей обычно равна 170 – 630 кДж/моль.

Силы Ван-дер-Ваальса имеют электромагнитную природу и определяются взаимодействием электрических диполей молекул ( см. курс электродинамики). В зависимости от того, имеют ли молекулы постоянные электрические дипольные моменты или они возникают вследствие поляризуемости электронных оболочек, различают в литературе следующие типы сил Ван-дер-Ваальса.

#### ***А) Ориентационные взаимодействия***

Как известно из курса электродинамики, энергия ориентационного взаимодействия  $U_{op}$  дипольных моментов  $P_1, P_2$  равна

$$U_{op}(R) = -\frac{e^2}{R-l_1} - \frac{e^2}{R+l_2} - \frac{e^2}{R+l_2-l_1} + \frac{e^2}{R}$$

Откуда при условии  $R \gg l_1, l_2$

$$U_{op}(R) = -\frac{2e^2 l_1 l_2}{R^3} = -\frac{2P_1 P_2}{R^3}$$

Если диполи свободны и следовательно могут быть в тепловом движении, то в среднем они будут получать ориентации, соответствующие притяжению. И тогда их собственная энергия  $E$  понижается. Вероятность взаимного расположения диполей, конечно, зависит от их энергии, и при энергии  $E \ll k_B T$ :

$$U_{op}(R) = -\frac{2P_1^2 P_2^2}{3k_B T R^6}$$

#### ***Б) Индукционные взаимодействия***

Как известно из курса электродинамики, если молекула имеет постоянный дипольный момент  $P_1$ , то она может навести диполь  $P_2$  в другой

молекуле, в случае если последняя обладает определённой поляризуемостью  $\alpha$ :

$$P_2 = \alpha P_1,$$

где  $P_2$  – наведённый диполь,  $E_1$  – напряжённость электрического поля в центре поляризуемой молекулы, создаваемая постоянным диполем  $P_1$  первой молекулы. Поле  $E_1$  диполя  $P_1$  на расстоянии  $R$  от постоянного диполя равно

$$E_1 = \frac{2P_1}{R^3},$$

при условии, что  $P_1$  и  $R$  расположены параллельно. Отсюда энергия индукционного взаимодействия  $U_{\text{инд}}$ , усреднённая по всем ориентациям постоянного диполя  $P_1$ , будет равна

$$U_{\text{инд}}(R) = -\frac{1}{2}E_1^2 = -\frac{2\alpha P_1^2}{R^6}$$

Заметим, что смещение электронов в одну сторону при поляризации молекулы соседним постоянным диполем может компенсироваться их смещением в противоположную сторону если есть такой же постоянный диполь с обратно направленным моментом, расположенный по другую сторону молекулы.

### ***В) Дисперсионные взаимодействия***

Хорошо известно, что наиболее распространёнными видами невалентных взаимодействий являются дисперсионные (их иногда называют поляризационными). Такие взаимодействия наблюдаются между молекулами, не имеющими постоянные дипольные моменты. Основная часть таких взаимодействий обусловлена внешними, то есть наиболее слабо связанными с атомом электронами. Природа дисперсионных взаимодействий носит квантово-механический характер и объясняется возникновением «мгновенных» диполей при движении электронов в молекулах.

Другими словами, появление дипольного момента в одной молекуле индуцирует дипольный момент в другой. Взаимодействие этих быстро меняющихся дипольных моментов приводит к тому, что изменение дипольного момента одного осциллятора вызывает добавочную поляризацию

в другом, и наоборот. Следовательно, эти два осциллятора становятся взаимосвязанными.

Энергия дисперсионного взаимодействия будет равна в этом случае

$$U_{дисп}(R) = - \frac{3I_1 I_2}{2(I_1 + I_2)} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{R^6},$$

где  $I_1, I_2$  – ионизационные потенциалы;  $\alpha_1, \alpha_2$  – поляризуемости молекул.

## 2) Водородная связь

Помимо сил Ван-дер-Ваальса важную и немалую роль в образовании структур белков играют так называемые «водородные» связи и кроме того электростатические взаимодействия между заряженными и полярными группами белков.

«Водородная» связь образуется между электроотрицательными атомами (O, N, F, Cl) при участии водорода. Водород образует ковалентную связь с одним из этих атомов. Природа «водородной» связи очень сложна и вызвана не только электростатическим притяжением. Из литературы известно, что расстояние между электроотрицательными атомами, связанными «водородной» связью, часто меньше ван-дер-ваальсовых радиусов взаимодействия этих же атомов на 0,02 – 0,09 нм. Считается, что сумма ван-дер-ваальсовых радиусов для атомов O...O равна 0,32 – 0,36 нм, но при образовании водородной связи O-H...O это расстояние уменьшается до 0,25 – 0,3 нм.

Наряду с электростатическим взаимодействием, ван-дер-ваальсовым притяжением и отталкиванием, в энергию водородной связи вносит вклад энергия размазывания связи двух электронов одного атома с неподелённой парой электронов другого электроотрицательного атома.

Как правило, значения энергии H-связи лежат в пределах – 12,6 – 33,6 кДж/моль. Рассчитывается, что протон может двигаться между электроотрицательными атомами водородной связи вдоль прямой, соединяющей их. При этом однако в различных точках протон испытывает

влияние различных по напряжённости электрических полей, образованных ядрами атомов одной молекулы и распределёнными электронами другой

### **3) Электростатические взаимодействия**

Такой вид взаимодействий не только вносит вклад в энергию водородных связей, но и имеет самостоятельную роль в образовании структур белков. Известно, что атомы в пептидных цепочках могут сильно отличаться по характеру распределения на них зарядов. При этом взаимодействие частично заряженных атомов как известно задается электростатическим потенциалом вида

$$U_{\text{эл-стат}} = \sum \frac{q_i q_j}{\varepsilon R_{ij}},$$

где  $q_i$ ,  $q_j$  – величины парциальных зарядов на атомах ( $i$ ,  $j$ ),  $R_{ij}$  – расстояние между атомами,  $\varepsilon$  – диэлектрическая постоянная. Величина этой постоянной зависит от поляризуемости атомов и их взаимного расположения. В литературе ее значение для белков обычно принимается равным 3,5.

Из-за учёта электростатических взаимодействий немного меняется расстояние между атомами и, как следствие их общее взаимное расположение в структуре белковых полимеров. Заметим в заключение этого параграфа, что представления о точечной локализации зарядов на атомных центрах не учитывают закономерности, связанные с объёмными взаимодействиями.

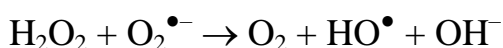
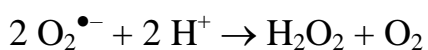
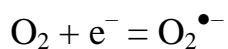
#### ***§1.4. Окислительный стресс и его влияние на структуру и конформационную подвижность белков. Медицинский аспект***

Окислительный стресс – это избыточное образование в клетках и тканях активных форм кислорода (АФК), которые не могут быть нейтрализованы антиоксидантами [7].

В основе феномена окислительного стресса (ОС) лежат окислительно-восстановительные реакции (ОВР), происходящие в клетках организма как в нормальных условиях, так и при патологических процессах. Окислительный стресс рассматривается в качестве важного патогенетического звена при развитии более чем 200 заболеваний [8].

Окислительный стресс (ОС), возникающий под действием неблагоприятных экзогенных факторов, а также в результате активации эндогенных механизмов генерации активных форм кислорода, ослабления антиоксидантной защиты организма, рассматривается в настоящее время в качестве патогенетического звена при возникновении и развитии многочисленных заболеваний [9, 10].

Рассмотрим основные активные формы кислорода. Незначительная часть молекулярного кислорода (1–3%) в результате цепи химических реакций 1-, 2- и 3-х электронного восстановления генерирует активные формы кислорода (АФК), радикальной и нерадикальной природы [4, 6-14].



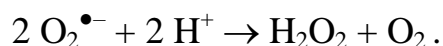
Важное биологическое значение имеют супероксидный радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), гидроксильный радикал ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), гидропероксильный и пероксильный ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) радикалы, перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), окись азота ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) и пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) [10].

Супероксидный радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) образуется при одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода с помощью различных оксидаз. Основное место его образования – митохондрии [14-16]. Супероксидный радикал не является сильным окислителем [16]. Его основное назначение – образование других форм АФК. Кроме того, он способен высвобождать ионы металлов переменной валентности из их комплексов с биологическими



молекулами, в частности, железо из ферритина, а также разрушать мембраны эритроцитов.

Супероксидный радикал нестабилен (время жизни в биологических субстратах составляет около  $10^{-6}$  с) и разрушается в реакции дисмутации, катализируемой супероксиддисмутазой или протекающей спонтанно, с образованием перекиси водорода, которая является окислителем умеренной силы:



При спонтанной реакции дисмутации одним из первоначально возникающих продуктов является синглетный кислород.

Перекись водорода также может образовываться из супероксидного радикала в присутствии оксидазы L-аминокислоты (LAAO) и ксантинооксидазы [15]. Нейтральная молекула перекиси водорода наименее реакционноспособна среди АФК и в отсутствие ионов металлов стабильна при физиологических значениях pH и температуры. Высокая диффузионная способность позволяет ей легко преодолевать плазматическую мембрану и участвовать в большом количестве реакций и образовании АФК [17].

Экзогенными источниками образования в организме человека активных форм кислорода являются: загрязнение воздуха и воды, табак, алкоголь, тяжелые или переходные металлы, наркотики, растворители, радиация и некоторые продукты питания, которые метаболизируются в свободные радикалы.

Для защиты от свободных радикалов клетками выработаны эффективные механизмы молекулярных реакций ликвидации АФК, называемые системой антиоксидантной защиты.

По локализации антиоксиданты можно разделить:

- 1) Антиоксиданты плазмы крови – аскорбиновая кислота, билирубин, мочевая кислота трансферрин, церулоплазмин,  $\beta$ -каротин;

- 2) Мембранные антиоксиданты – токоферол, убихинон, каротиноиды;
- 3) Внутриклеточные антиоксиданты – супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, глутатион, ферритин, металлотioneины, пероксиредоксины, тиоредоксины.

По природе и действию антиоксиданты разделяют на ферментативные и неферментативные:

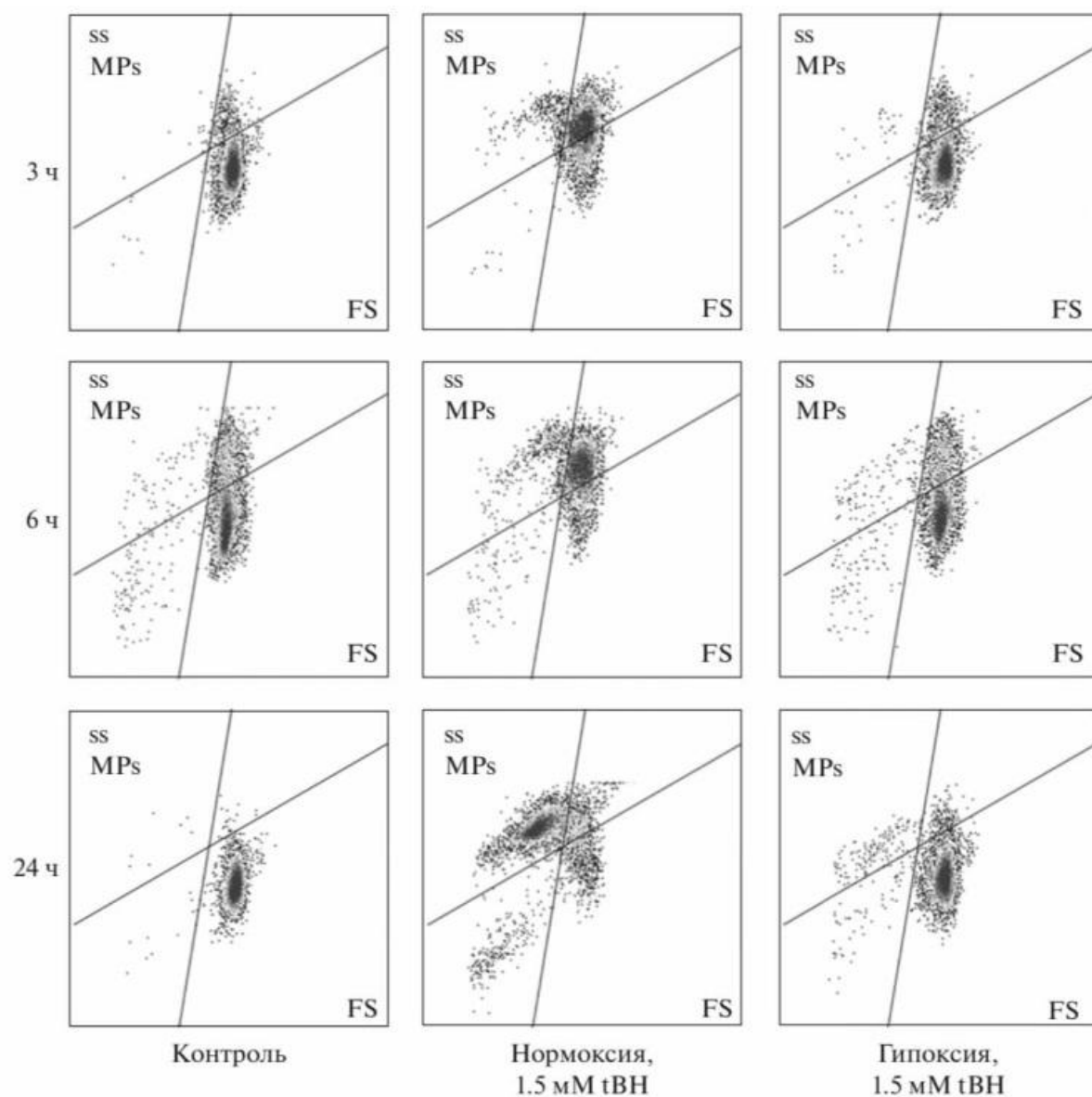
1) Ферментативные (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, лактопероксидаза, тиреопероксидаза, церулоплазмин)

2) Неферментативные (трансферрин, ферритин, металлотioneины, тиоредоксины, глутатион, аскорбиновая кислота, токоферол,  $\beta$ -каротин, ликопин, биофлавоноиды, селен, убихинон).

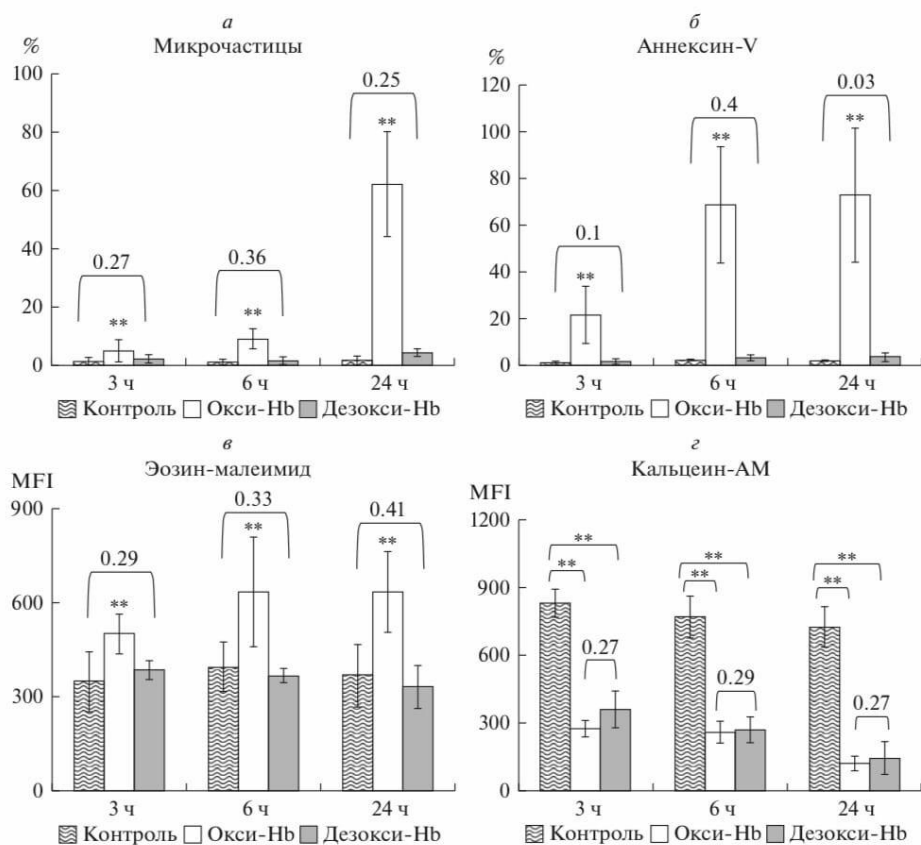
Дисбаланс равновесия между появлением активных форм кислорода и их нейтрализацией антиоксидантными системами индуцирует в организме появление окислительного стресса[18].

Окислительный стресс (ОС), в частности, является основным фактором, индуцирующим трансформацию эритроцитов [19-21]. В гипоксических условиях ОС должен развиваться интенсивнее в связи с переключением пентозофосфатного пути на гликолиз [11, 21] и торможением синтеза NADPH, необходимого для восстановления метгемоглобинредуктазой окисленного гемоглобина Hb [22].

Окислительный стресс напрямую связан с проблемами хранения компонентов крови [15]. В частности, при долговременном хранении концентратов эритроцитов в аэробных условиях увеличивается образование окисленных форм гемоглобина Hb (мет-Hb, гемихром), что может приводить к различным осложнениям у реципиентов при переливании крови [23].



*Рис. Гипоксические условия ингибируют образование микрочастиц эритроцитов при окислительном стрессе. Суспензию эритроцитов ( $0,5 \times 10^9$  кл/мл) инкубировали с 1,5 мМ tBH в течение 3, 6 и 24 часов. Показаны точечные диаграммы (dot-plots) для проб через 3, 6, 24 часов (данные репрезентативного эксперимента на проточном цитометре). \*MPs – микрочастицы.*



*Рис. Маркерные события, предшествующие и/или приводящие к образованию микрочастиц, ингибируются в гипоксических условиях. Суспензию эритроцитов ( $0,5 \times 10^9$  кл/мл) инкубировали с 1,5 мМ tBH в условиях нормоксии (окси-tBH) и гипоксии (дезоксид-tBH). В качестве контроля использовали интактные клетки. а – образование микрочастиц эритроцитов при ОС значительно ингибировалось в условиях гипоксии; б – % аннексин-V-положительных клеток при окислительном стрессе в условиях нормоксии выше, чем при гипоксии; в – кластеризация AE1 при ОС в условиях нормоксии выше, чем при гипоксии; г – сходное ингибирование эстеразной активности в условиях окислительного стресса при гипоксии и нормоксии. \*\*  $p < 0.01$  (t-критерий Стьюдента).*

В модели окислительного стресса [20] процент окисления Нб до ферриформ (рис.) и ингибирование эстеразной активности (рис.) при нормоксии и гипоксии практически не различались. Полученные результаты указывают на то, что гипоксические условия не влияют на первичное окислительное действие tBH. Тем удивительней, что в гипоксических условиях замедлена

как экстернализация фосфатидилсерина и гибель клеток по апоптозному сценарию (рис.), так и образование микрочастиц (рис.), обусловленное кластеризацией анионного транспортера AE1 (рис.). Можно предположить, что ингибирующий эффект гипоксии связан с конкуренцией форм Hb за сайт связывания цитоплазматического домена анионного транспортера AE1 (cdAE1). Связанная структура дезокси-Hb-cdAE1 может ингибировать кластеризацию AE1, индуцируемую окисленными формами гемоглобина Fe(IV) и Fe(V) и приводящую к образованию микрочастиц. Полученные результаты указывают на то, что гипоксические условия могут благоприятно влиять на хранение крови. Действительно, группой Yoshida предложен и запатентован [21] метод массовой деоксигенации концентратов эритроцитов и показано, что при анаэробном хранении эритроцитов гемолиз ниже, чем в аэробных условиях, а также лучше сохраняется морфология клеток, снижена осмотическая резистентность и подавлено образование микрочастиц [20]. Метаболические исследования частично подтвердили положительное влияние гипоксии на сохранение уровня АТФ и 2,3-ДФГ, несмотря на уменьшение уровня восстановленного глутатиона (снижение синтеза NADPH при блокаде пентозофосфатного пути). При хранении эритроцитов в гипоксических условиях увеличено восстановление нитрита до нитрата, которое ассоциировано с образованием мет-Hb [20]. Обсуждается способность эритроцитов продуцировать NO в условиях гипоксии (нитрит-редуктазная активность Hb в дезокси-форме). Активно продвигается гипотеза, согласно которой эритроциты являются одним из важнейших элементов транспортировки NO внутри организма [24]. Однако показано, что эритроциты способны только захватывать NO (с последующим образованием нитритов и нитратов), но ни при каких физиологических условиях (гипоксия, гипоксия–нормоксия) не способны продуцировать NO [25-26].

Мысль о том, что окислительное свободнорадикальное повреждение липидов играет важную роль в патогенезе атеросклероза впервые была высказана еще в 1952 году в [27]: содержание липопероксидов в аорте

человека с атеросклеротическими поражениями выше, чем в непораженной стенке сосуда. Результаты, полученные в последующие годы, позволяют сформулировать концепцию, обосновывающую существование свободнорадикального звена в патогенезе атеросклероза [28].

Согласно данным [28], пусковым моментом атерогенеза может быть увеличение скорости генерирования активных форм кислорода (АФК) в мембранах эндоплазматического ретикулума гепатоцитов при алиментарной гиперхолестеринемии, происходящее на фоне резкого снижения активности антиоксидантных ферментов в цитозоле этих клеток. В этих условиях гепатоциты могут секретировать в кровяное русло липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), включающие окисленные липиды, которые в кровотоке, в присутствии  $O_2$  и гемового железа, подвергаются окислительной деструкции с образованием малонового диальдегида (МДА). Это, в свою очередь, должно приводить к накоплению продуктов окисления в циркулирующих в крови липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) и вызывать их окислительную модификацию. Действительно, в крови больных атеросклерозом с использованием разнообразных физико-химических методов удалось обнаружить существенное увеличение содержания как первичных, так и вторичных продуктов свободнорадикального окисления, причем в крови этих больных выявлено также резкое снижение активности GSH-пероксидазы. Полученные данные обосновывают высокую вероятность проникновения в стенку сосуда окисленных или МДА-модифицированных ЛПНП, что в настоящее время рассматривается в качестве одного из факторов риска возникновения атеросклероза [29].

Действительно, в зонах атеросклеротического поражения аорты человека содержание основного липидного класса ЛПНП – ненасыщенных эфиров холестерина аномально высоко, причем 90% липидных пероксидов, выявляемых в атеросклеротически пораженной стенке сосуда, обнаруживается в составе именно этого класса липидов. При прогрессировании атеросклеротического поражения содержание перекисей

липидов в стенке сосуда увеличивается, тогда как активность утилизирующего их фермента (GSH-пероксидаза) снижается.

На основании анализа стереоизомеров окисленных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) из атеросклеротических поражений аорты человека [29] можно заключить, что интенсификация окисления ПНЖК в стенке сосуда при атерогенезе может быть следствием индукции процесса вторичными свободными радикалами, возникающими при разложении образованных ферментативно липопероксидов.

Накопление окисленных ПНЖК в стенке сосуда при атерогенезе сопровождается ингибированием простаглицлиносинтазы и, тем самым, усилением пролиферации гладкомышечных клеток (простаглицлин подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток), а также увеличением опасности возникновения тромбозов вследствие возрастания тромбоксан/простаглицлинового соотношения [28].

Вторичные свободные радикалы оказывают разрушительное действие на клеточные структуры:

	Структура	Образуется в реакции
Гидроксильный радикал	$\text{HO}\cdot$	$\text{Fe}^{2+} + \text{HOON} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}\cdot$ $\text{Fe}^{2+} + \text{ClO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{Cl}^- + \text{HO}\cdot$
Липидные радикалы	$\text{LO}\cdot$ $\text{L}\cdot$ $\text{LOO}\cdot$	$\text{Fe}^{2+} + \text{LOON} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{LO}\cdot$ $\text{LO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOH} + \text{L}\cdot$ $\text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}\cdot$
Супероксидный радикал	$\text{O}\cdot\text{O}^-$	$\text{HQ}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{Q} + \text{O}\cdot\text{O}^- + \text{H}^+$

Таким образом, с позиций свободнорадикальной теории атеросклероза можно удовлетворительно объяснить ключевые моменты атерогенеза: образование пенных клеток, липоидоз аорты, миграцию гладкомышечных клеток из меди и в интиму и усиление их пролиферации, а также возникновение основного осложнения атеросклероза – тромбоза сосудов.

Активные формы кислорода и азота вовлечены в атеросклероз, в основном, на уровне повреждения липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), которые, в свою очередь, приводят к аккумуляции холестерина в макрофагах.

Разнообразие окислительных модификаций липидов и белков в местах атеросклеротического повреждения открыло исследователям удивительную сложность механизмов окислительного повреждения при атеросклерозе [30].

### ***§1.5. Физические основы флуоресцентной спектроскопии***

Физическое явление «люминесценция» описывает эмиссию света. В основе «люминесценции» лежит явление возбуждения атомов и молекулы и последующее за ним их излучение при возвращении возбужденных атомов и молекул в исходное состояние

Измерение «люминесценции» можно проводить различными способами. С помощью «люминесценции» можно изучать как отдельные молекулы, так и различные вещества .

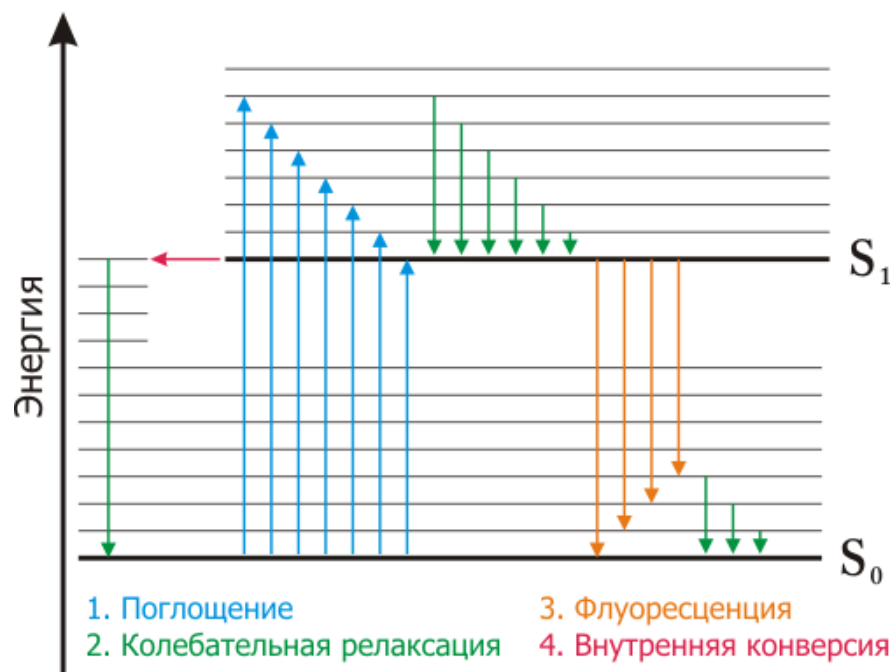
Поглощение некоторым объектом падающего света определяется по формуле

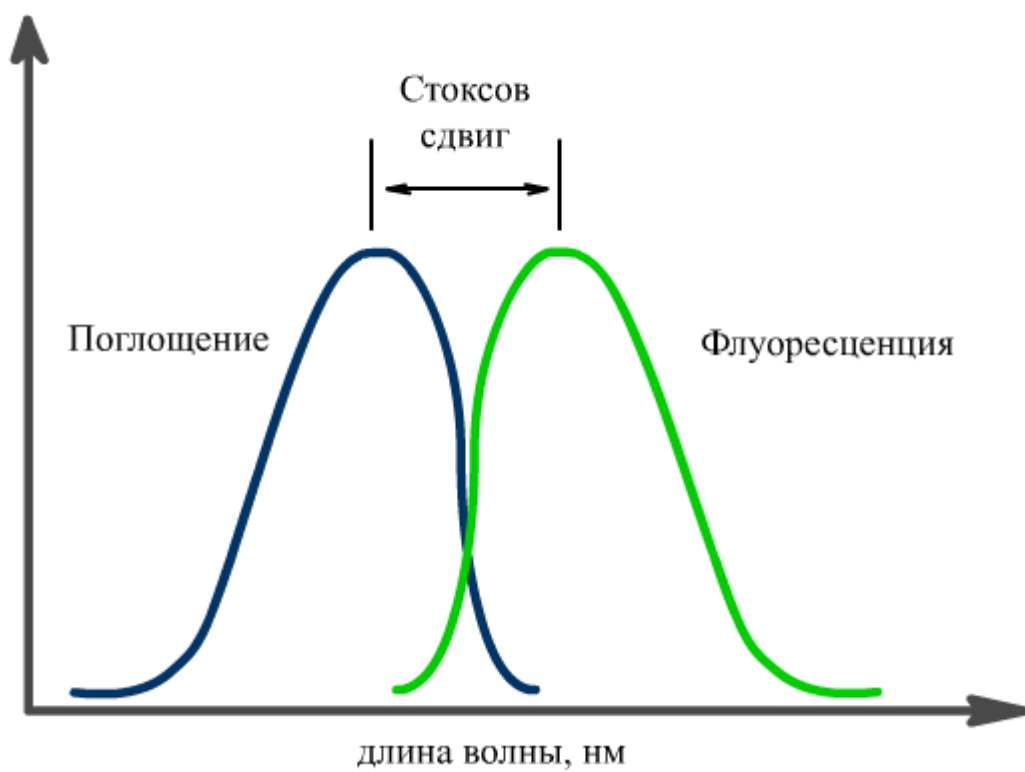
$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l,$$

где  $I_0$  – интенсивность света, падающего на объект,  $I$  – интенсивность света, прошедшего сквозь образец,  $c$  – концентрация поглощающих частиц,  $\varepsilon(\lambda)$  – молярный коэффициент экстинкции,  $l$  – толщина образца.

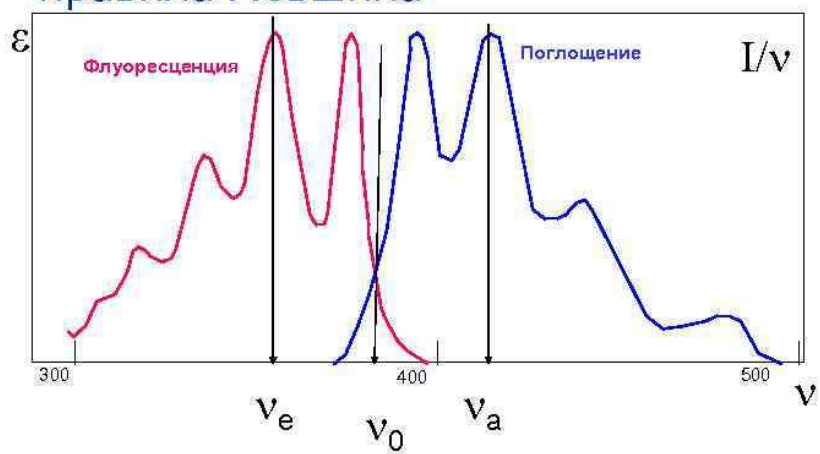
«Флуоресценция» и «фосфоресценция» являются частными подвидами «люминесценции» . Они отличаются между собой электронной природой возбуждённого состояния, с которого происходит излучение света. А именно - либо с первого возбуждённого синглетного состояния ( $S_1$ ) - «флуоресценция», либо с триплетного состояния ( $T_1$ ) - «фосфоресценция».







## Графическое представление правила Левшина



### Диаграмма Яблонского



Другими словами, в литературе «флуоресценция» определяется как переход с излучением света между двумя состояниями равной мультиплетности. Тогда «фосфоресценция» определяется как переход с излучением света между двумя состояниями различной мультиплетности.

Молекула может возбуждаться и до более высокого электронного и колебательного уровня. Тогда она обычно испытывает безызлучательную релаксацию в состояние  $S_1$  за время, приблизительно равное  $10^{-14}$  с. После этого молекула может возвратиться в основное электронное состояние  $S_0$ . Такое возвращение может происходить различными способами. Из них «флуоресценция» определяется разностью энергий ( $S_1 - S_0$ ), которая излучается как квант (фотон) света. Спектры поглощения и излучения подчиняются правилу зеркальной симметрии ( см. цветной рисунок )

С помощью диаграммы Яблонского ( см. цветную диаграмму ) можно понять принцип формирования спектров поглощения, «флуоресценции» и «фосфоресценции». При « флуоресценции» после возбуждения, молекула , через внутреннюю конверсию и тепловое рассеяние , быстро переходит безызлучательным способом в основное колебательное состояние  $S_1$ . С этого уровня затем осуществляется переход в основное электронное состояние  $S_0$ .

Длина волны и интенсивность излучения (иногда говорят –«эмиссии») «флуоресценции» существенно зависят от различных внешних факторов. Среди них можно отметить температуру, вязкость и полярность растворителя и так далее и тому подобное. Из литературы известно, что с увеличением полярности растворителя «эмиссия» становится слабее, а спектры «эмиссии» сдвигаются в «красную» область спектра.

### ***§1.6. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях конформационных состояний белков***

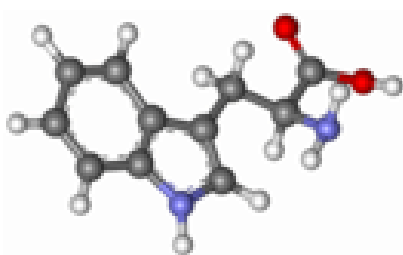
В результате действия различных внешних факторов может начаться процесс денатурации белков [31-34].

В [35] рассматриваются конформационные перестройки альбумина при взаимодействии с поверхностью наноалмазов. Под действием различных внешних факторов с белками может происходить несколько разных процессов, в том числе агрегация [36]. Показано, что формирование фибрилл возможно в результате различных молекулярных процессов [32, 36, 37]. При этом вторичная структура белков изменяется принципиальным образом: увеличивается содержание  $\beta$ -структур, что является первым шагом для роста упорядоченных агрегатов [38].

В [39] выявлены особенности проявления конформационных изменений альбумина при гликировании и его термической денатурации методами флуоресцентной, абсорбционной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния.

В [40] ставилась цель сравнить термическую денатурацию глобул при pH 3,0 и при pH 7,4. Образование фибриллярных структур исследовано в [41–43], а также состояние расплавленной глобулы рассмотрено в [44]. Индикатором конформационных изменений белка может являться его триптофановая флуоресценция, так как триптофановые остатки чувствительны к изменениям своего микроокружения [45].

При термической денатурации белка происходит коротковолновый сдвиг спектра триптофановой флуоресценции вследствие уменьшения полярности окружения триптофановых остатков в БСА [45].



В [46-47] исследовали изменение флуоресценции гидрофобного зонда Нильский красный, эмиссия которого возрастает при встраивании его в области с низкой полярностью, например, в гидрофобные домены белков и их агрегатов. Продемонстрировано, что при pH 7,4 белок имеет классическую глобулярную форму в виде сердца [48-49]. Полученные данные хорошо согласуются с данными [50]. В настоящее время определены времена жизни флуоресценции БСА при pH 7,4 [51].

## Глава 2. Методическая часть экспериментов

### *§2.1. Приготовление растворов БСА и перекиси водорода для анализа тушения триптофановой флуоресценции белка*

Растворы 5 мкМ бычьего сывороточного альбумина БСА (Sigma) приготовлены в двух буферных системах:

- 1) 0,1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 0,1 М  $\text{KOH}$  (рН 3,0 – 5,0);
- 2) 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 М  $\text{NaOH}$  (рН 6,0 – 7,0).

К растворам БСА (5 мкМ) добавлены различные концентрации перекиси водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 – 200 мкМ) при рН 3,0 – 7,0.

### *§2.2. Приготовление растворов БСА и перекиси водорода с добавлением флуоресцентного зонда для анализа флуоресценции зонда*

В готовые белковые растворы (5 мкМ БСА) с различными концентрациями перекиси водорода (5 – 200 мкМ) при рН 4,0 последним добавлялся флуоресцентный зонд – 5 мкМ эозин (ч.д.а., «Реахим», Россия).

### *§2.3. Методика экспериментов для исследования тушения триптофановой флуоресценции БСА в растворах с перекисью водорода*

Флуоресцентные исследования образцов «БСА –  $\text{H}_2\text{O}_2$ » проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 при комнатной температуре.

Измерения собственной триптофановой флуоресценции образцов БСА проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них различных концентраций перекиси водорода.

Триптофановая флуоресценция БСА регистрировалась в диапазоне 300–500 нм при возбуждении светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм. Спектры флуоресценции БСА обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

#### ***§2.4. Методика экспериментов для исследования флуоресценции зонда в растворах БСА и перекиси водорода***

Флуоресцентные исследования образцов «БСА –  $\text{H}_2\text{O}_2$  – эозин» проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 при комнатной температуре. Измерения флуоресценции образцов проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них и перекиси водорода, и эозина.

Флуоресценция эозина, находящегося в растворах с БСА и перекисью водорода, регистрировалась в диапазоне 530 – 750 нм при возбуждении светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм.

Спектры флуоресценции эозина в растворах «белок –  $\text{H}_2\text{O}_2$ » обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.



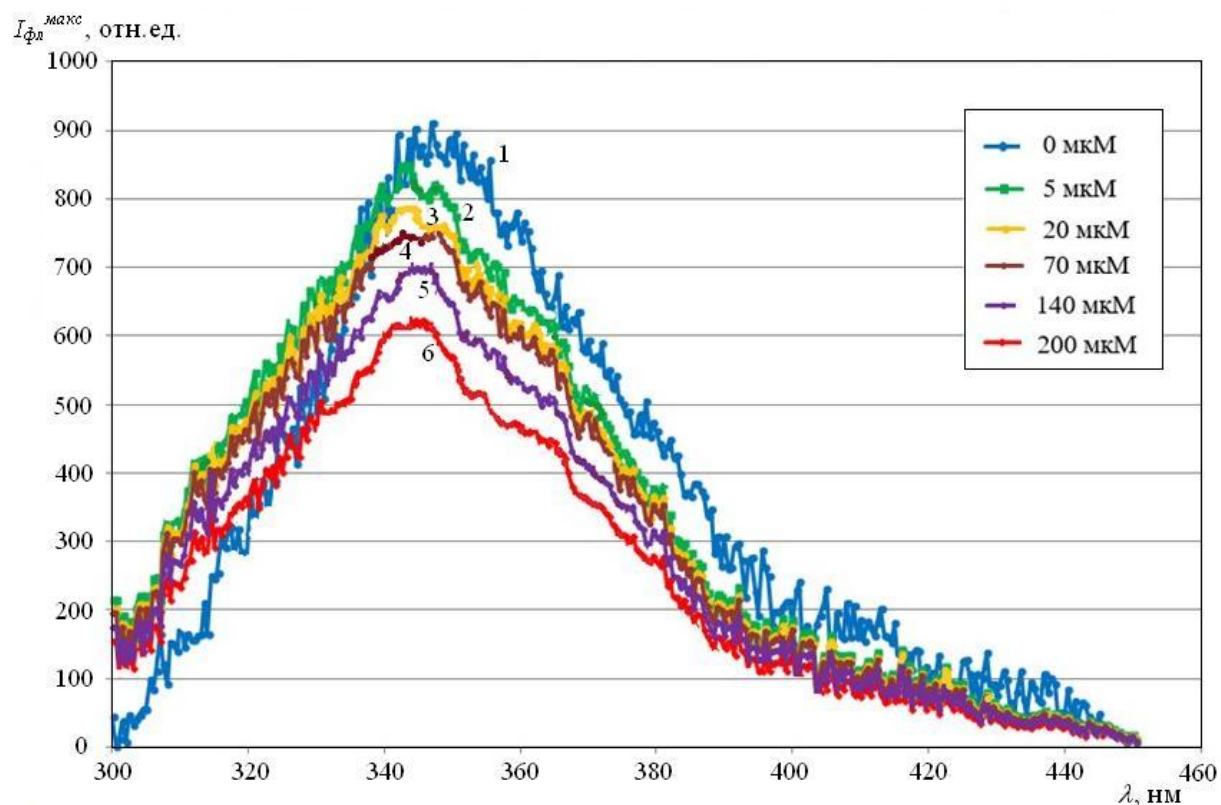
### **Глава 3. Моделирование молекулярной динамики глобул бычьего сывороточного альбумина при воздействии окислительного агента по данным флуоресцентного анализа**

В ходе исследований получены спектры собственной триптофановой флуоресценции БСА при добавлении в белковые растворы перекиси водорода  $H_2O_2$  (5 – 200 мкМ) при рН 3,0 – 7,0, в качестве примера на рис. 3.1 представлены спектры флуоресценции БСА при рН 5,0.

Обнаружено (рис. 3.2), что при всех значениях рН (3,0 – 7,0) происходит тушение триптофановой флуоресценции БСА при добавлении  $H_2O_2$ . Добавление 5 мкМ  $H_2O_2$ , концентрации равной концентрации БСА, приводит к незначительному тушению флуоресценции БСА, а значит, к незначительному изменению конформации белка под действием окислительного агента. Добавление больших концентраций ( $> 5$  мкМ)  $H_2O_2$  в белковые растворы приводит к значительному тушению триптофановой флуоресценции БСА, и, следовательно, к существенному изменению и повреждению структуры БСА под действием  $H_2O_2$ .

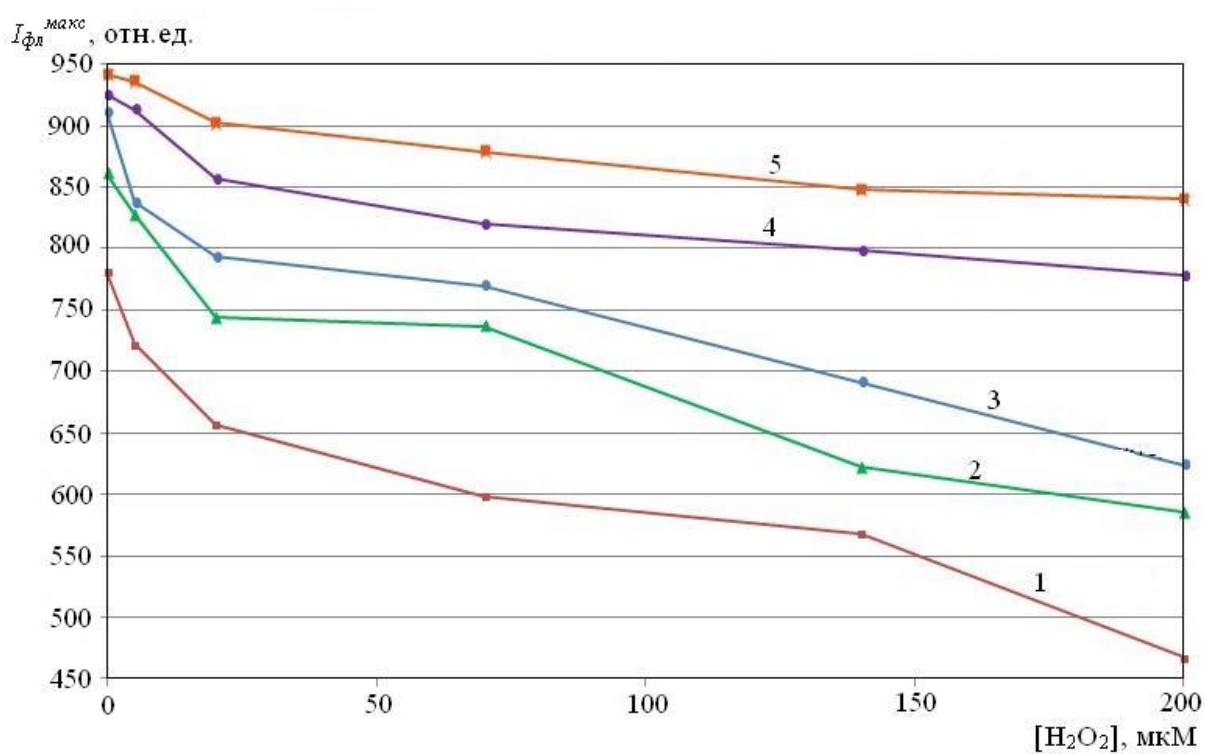
При сравнении величины тушения флуоресценции БСА при добавлении  $H_2O_2$  в растворы при различных значениях рН видно (рис. 3.2), что более сильное тушение флуоресценции имеет место при более низких значениях рН. Было рассчитано среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА при изменении концентрации  $H_2O_2$  в зависимости от рН (рис. 3.3). Значительное тушение флуоресценции БСА под действием  $H_2O_2$  происходит при значениях рН 3,0–5,0, меньших изоэлектрической точки БСА. Это объясняется тем, что  $H_2O_2$  как окислитель действует сильнее в кислой среде. Следовательно, более сильное перекисное повреждение БСА и изменение его конформации происходит при более низких значениях рН.

На рис. 3.4 представлена зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА от рН при различных концентрациях  $H_2O_2$ .



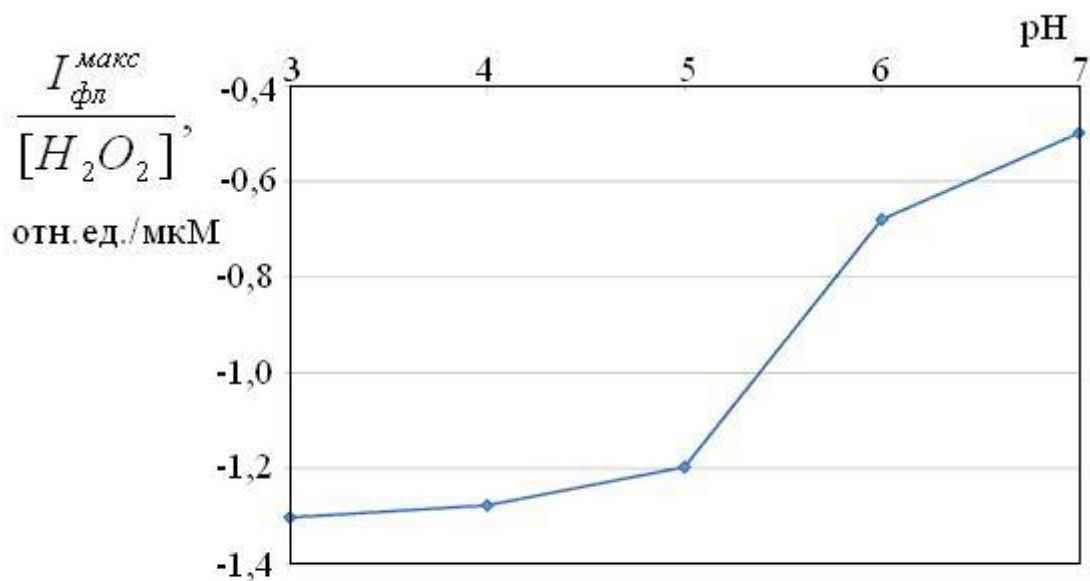
Спектры флуоресценции БСА ( $\lambda_{\text{возб}}=295\text{нм}$ ) в растворах (рН 5,0) с различными концентрациями  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 0 мкМ (1), 5 мкМ (2), 20 мкМ (3), 70 мкМ (4), 140 мкМ (5), 200 мкМ (6).

Рис. 3.1. Спектры флуоресценции БСА ( $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$ ) в растворах (рН 5,0) с различными концентрациями  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 0 мкМ (1), 5 мкМ (2), 20 мкМ (3), 70 мкМ (4), 140 мкМ (5), 200 мкМ (6).



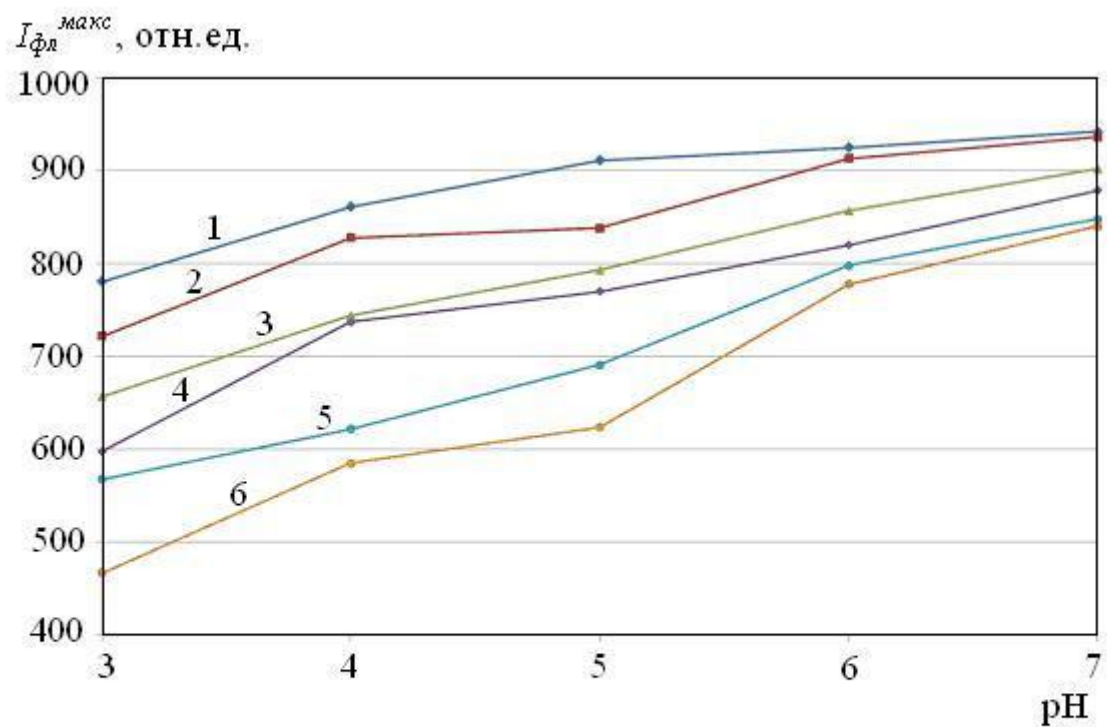
Интенсивность в максимуме спектра флуоресценции БСА в зависимости от концентрации  $H_2O_2$  при различных значениях рН: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5).

Рис. 3.2. Интенсивность в максимуме спектра флуоресценции БСА в зависимости от концентрации  $H_2O_2$  при различных значениях рН: 3,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5).



Среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА при изменении концентрации  $H_2O_2$  в растворе в зависимости от значения рН.

Рис. 3.3. Среднее изменение интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА при изменении концентрации  $H_2O_2$  в растворе в зависимости от значения рН.



Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА от значений pH растворов с различными концентрациями  $\text{H}_2\text{O}_2$  : 0 мкМ (1), 5 мкМ (2), 20 мкМ (3), 70 мкМ (4), 140 мкМ (5), 200 мкМ (6).

Рис. 3.4. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции БСА от значений pH растворов с различными концентрациями  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 0 мкМ (1), 5 мкМ (2), 20 мкМ (3), 70 мкМ (4), 140 мкМ (5), 200 мкМ (6).

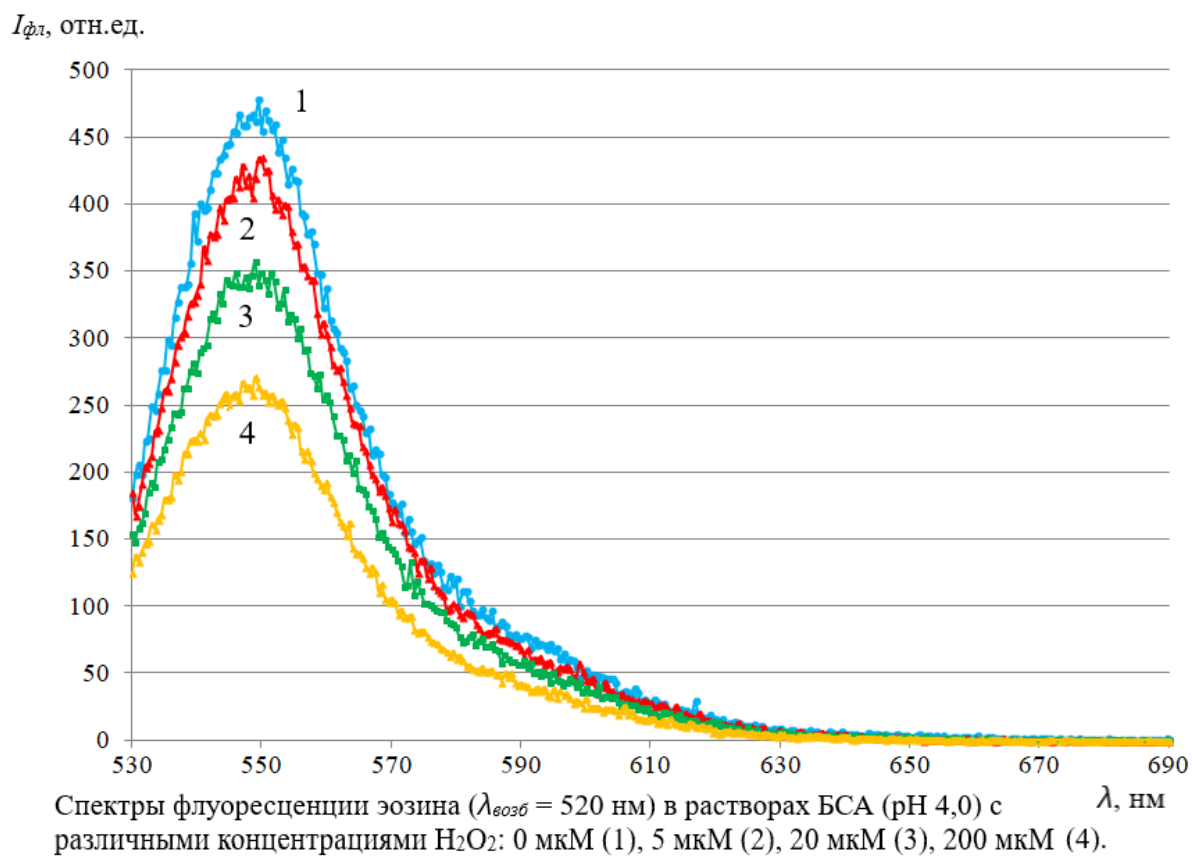


Рис. 3.5. Спектры флуоресценции эозина ( $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм) в растворах БСА (рН 4,0) с различными концентрациями  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 0 мкМ (1), 5 мкМ (2), 20 мкМ (3), 200 мкМ (4).

Видно (рис. 3.4), что добавление 5 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в раствор приводит к небольшому тушению флуоресценции БСА при всех значениях рН, а вот добавление 20–200 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  приводит к значительному тушению флуоресценции БСА, особенно при низких значениях рН.

В водных растворах перекись водорода ведет себя как очень слабая кислота, проявляя слабые кислотные свойства и диссоциируя:



Образовавшиеся при диссоциации перекиси водорода свободные радикалы повреждают нативную конформацию белка. При состоянии окислительного стресса под действием перекиси водорода и свободнорадикальных продуктов ее диссоциации разрушаются связи, участвующие в образовании нативной конформации белка, происходит изменение микроокружения триптофановых остатков БСА и, как следствие, происходит тушение триптофановой флуоресценции БСА.

Также в работе получены спектры флуоресценции зонда эозина ( $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм) в растворах БСА (рН 4,0) с различными концентрациями  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 3.5), значение рН 4,0 было выбрано в связи с тем, что максимально эффективное связывание эозина с БСА имеет место при рН < 5,0, когда белок в целом положительно заряжен, а эозин находится в форме моноаниона.

Видно (рис. 3.5), что в белковых растворах при добавлении  $\text{H}_2\text{O}_2$  происходит тушение флуоресценции эозина, причем интенсивность флуоресценции зонда меняется более резко, чем триптофановая флуоресценция белка в растворах  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Это явление можно объяснить как окислительным повреждением перекисью водорода центров связывания зонда на белке, так и взаимодействием самого зонда с  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Поэтому, несмотря на более яркое тушение флуоресценции зонда по сравнению с тушением триптофановой флуоресценции, в этой системе «БСА –  $\text{H}_2\text{O}_2$ » для внесения четкости в выводы предпочтительнее анализировать собственную белковую флуоресценцию, а не зондовую флуоресценцию, что и представлено ранее в данной работе.

## Основные результаты и выводы

1. Методами флуоресцентного анализа исследована молекулярная динамика глобул бычьего сывороточного альбумина при окислительном повреждении перекисью водорода: проведен анализ как собственной белковой флуоресценции, так и флуоресценции зонда в растворах белка и окислительного агента.
2. Зарегистрировано тушение собственной триптофановой флуоресценции БСА в растворах перекиси водорода и тушение флуоресценции зонда эозина в растворах БСА и перекиси водорода при значениях рН 3,0 – 7,0.
3. Обнаруженное тушение триптофановой флуоресценции БСА и флуоресценции зонда эозина в растворах «БСА –  $\text{H}_2\text{O}_2$ » объяснено тем, что в состоянии окислительного стресса под действием перекиси водорода и ее свободнорадикальных продуктов разрушаются связи, участвующие в образовании нативной конформации глобул БСА.
4. Зарегистрировано, что более значительное перекисное повреждение БСА и изменение его конформации происходит при более низких значениях рН в связи тем, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  как окислитель действует сильнее в кислой среде.



## Список цитируемой литературы

1. Фаллер Д.М., Шилдс Д. «Молекулярная биология клетки» // Москва, Бином-пресс, 2006.
2. «Физиология человека» в 3-х томах под ред. Шмидта Р., Тевса Г. // Москва, Мир, 1996.
3. Эллиот В., Эллиот Д. «Биохимия и молекулярная биология» // Москва, Наука, 2002.
4. Ленинджер А. «Биохимия» // Москва, Мир, 1972.
5. Рубин А.Б. «Биофизика» // Москва, Издательство МГУ, 2004.
6. Степанов В.М. «Молекулярная биология. Структура и функции белков» // Москва, Издательство МГУ, 2005.
7. Кирпичникова Е. Окислительный стресс и воспаление: роль полифенолов. // Актуальная эндокринология, 2017, № 1, с. 71-78.
8. Ходос М.Я., Казаков Я.Е., Видревич М.Б., Брайнина Х.З. Окислительный стресс и его роль в патогенезе. // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2017, т. 14, № 4, с. 381-398.
9. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. // Новосибирск: АРТА, 2008.
10. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. // Труды ИСА РАН, 2006, т. 19, с. 50-69.
11. Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A., Metodiev M.V., Cooper C.E. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. // Free Radic. Biol. Med., 2017, v. 103, p. 95–106.
12. Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии: состояние проблемы и перспективы развития. // Успехи химии, 2015, т. 84, № 2, с. 194-224.

13. Pisoschi A.M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. // *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, v. 97, № 5, p. 55–74.
14. Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. // *World Allergy Organ J.*, 2012, v. 5, p. 9-19.
15. Quaye K. Chapter 6. Oxidative Stress in Human Health and Disease. In: Roy P.K. eds. *Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario*. // InTech., 2012, p. 97-120.
16. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. // *Journal Biological Chemistry*, 2013, v. 288, № 37, p. 26464–26472.
17. Salman K.A., Ashraf S. Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. // *Asia-Pacific Journal Molecular Biology and Biotechnology*, 2013, v. 21, № 2, p. 42-49.
18. Фурман Ю.В., Артюшкова Е.Б., Аниканов А.В. Окислительный стресс и антиоксиданты. // *Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания*, 2019, № 1(17), с. 1-3.
19. D'Alessandro A., Kriebardis A.G., Rinalducci S., Antonelou M.H., Hansen K.C., Papassideri I.S., Zolla L. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. // *Transfusion*, 2015, v. 55, № 1, p. 205–219.
20. Zolla L., D'alessandro A., Rinalducci S., D'amici G.M., Pupella S., Vaglio S., Grazzini G. Classic and alternative red blood cell storage strategies: Seven years of “-omics” investigations. // *Blood Transfus*, 2015, v. 13, № 1, p. 21–31.
21. Yoshida T., Prudent M., D'Alessandro A. Red blood cell storage lesion: Causes and potential clinical consequences. // *Blood Transfus*, 2019, v. 17, № 1, p. 27–52.
22. Arashiki N., Kimata N., Manno S., Mohandas N., Takakuwa Yu.. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for Band 3 clustering: Mechanistic insights into human erythrocyte senescence. // *Biochemistry*, 2013, v. 52, p. 5760–5769.

23. Schnell K.F., Besl E., von der Mosel R. Phosphate transport in human red blood cells: Concentration dependence and pH dependence of the unidirectional phosphate flux at equilibrium conditions. // *J. Membr. Biol.*, 1981, v. 61, № 3, p. 173–192.
24. Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T. Mechanisms of nitrite bioactivation. // *Nitric Oxide*, 2014, v. 38, p. 58–68.
25. Gambaryan S., Subramanian H., Kehrer L., Mindukshev I., Sudnitsyna J., Reiss C., Rukoyatkina N., Friebe A., Sharina I., Martin E., Walter U. Erythrocytes do not activate purified and platelet soluble guanylate cyclases even in conditions favourable for NO synthesis. // *Cell. Commun. Signal*, 2016, v. 14, № 1, p. 16.
26. Миндукшев И.В., Судницына Ю.С., Скверчинская Ю.С., Андреева А.Ю., Добрылко И.А., Сенченкова Е.Ю., Кривченко А.И., Гамбарян С.П. // *Биологические мембраны*, 2019, т. 36, № 5, с. 358-372.
27. Glavind J, Hartmann S., Clemmensen J., Jessen K.E., Dam H. // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1952, v. 30, p. 1-6.
28. Ланкин В.З. Атеросклероз как пример свободнорадикальной патологии: механизмы нарушения ферментативной регуляции процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов в биомембранах при атерогенезе, в кн.: *Биоантиоксидант*. // Тюмень, Изд-во ТГУ, 1997, с. 51-53.
29. Steinberg D. Role of oxydized LDL and antioxidants in atherosclerosis, in: *Nutrition and Biotechnology in Heart Disease and Cancer* (Longenecker J.B. et al., eds). // NY, Plenum Press, 1995, p. 39-48.
30. Patel R.P., Moellering D., Murphy-Ulrich J., Jo H., Beckman J.S., Darley-Usmar V.M. // *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, v. 28, p. 1780-1794.
31. Шмидт В. «Оптическая спектроскопия для химиков и биологов» // Москва, Мир, 2007.
32. Lin V. J. C., Koenig J .L. Raman studies of bovine serum albumin. // *Biopolymers*, 1976, V. 15, p. 203–218.

33. Hayakawa I., Kajikara J., Morikawa K., Oda M., Fujio Y. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals. // *J. Food Sci.*, 1992, v. 57, p. 288–292.
34. Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Mankova A. A., Sakodynskaya I. K. Effect of thermal denaturation, inhibition, and cleavage of disulfide bonds on the low-frequency Raman and FTIR spectra of chymotrypsin and albumin. // *J. Biomed. Optics*, 2015, v. 2, p. 051015-1–051015-6.
35. Svetlakova A. S., Brandt N. N., Priezzhev A. V., Chikishev A. Yu. Raman microspectroscopy of nanodiamond-induced structural changes in albumin. // *J. Biomed. Optics*, 2015, v. 20, p. 047004-1–047004-5.
36. Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH : comparison with human serum albumin. // *Eur. Biophys J.*, 2006, v. 36, p. 717–725.
37. Shang L., Wang Y. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin : Gold Nanoparticle Bioconjugates : A Spectroscopic Study. // *Langmuir*, 2007, v. 23, p. 2714–2721.
38. Wahl M. Time-Correlated Single Photon Counting. URL: <http://www.picoquant.com> (дата обращения: 14.01.2017).
39. Bhattacharya M., Jain N., Mukhopadhyay S. Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin. // *J. Phys. Chem.*, 2011, v. 115, p. 4195–4205.
40. Ровнягина Н.Р., Тихонова Т.Н., Молоденский Д.С., Ширшин Е.А. Детектирование конформационных изменений альбумина при его гликировании и термической денатурации методами флуоресцентной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния. // *Известия Саратовского университета*, 2017, т. 17, № 3, с. 179-190
41. Blake C., Serpell L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous  $\beta$ -sheet helix. // *Structure*, 1996, v. 4, p. 989–998.

42. Wu C., Wang Z., Lei H., Zhang W., Duan Y. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. // *J. Amer. Chem. Soc.*, 2007, v. 129, p. 1225–1232.
43. Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. Aromatic cross-strand ladders control the structure and stability of  $\beta$ -rich peptide self-assembly mimics. // *J. Mol. Biol.*, 2008, v. 383, p. 205–213.
44. Yang J., Dunker A. K., Powers J. R., Clark S., Swanson B. G.  $\beta$ -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure. // *J. Agric. Food. Chem.*, 2001, v. 49, p. 3236–3243.
45. Sulkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. // *Mol. Struct.*, 2002, v. 614, p. 227–232.
46. Tajalli H., Gilani A. G., Zakerhamidi M. S., Tajalli P. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media. // *Dyes and Pigments*, 2008, v. 78, p. 15–24.
47. Okamoto A., Tainaka K., Fujiwara Y. Nile Red nucleoside: Design of a solvatofluorochromic nucleoside as an indicator of micropolarity around DNA. // *J. Org. Chem.*, 2006, v. 71, p. 3592–3598.
48. Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S. Molten globule-like state of human serum albumin at low pH. // *FEBS*, 1999, v. 266, p. 26–32.
49. Leggio C., Galantini L., Pavel N. V. About the albumin structure in solution : cigar Expanded form versus heart Normal shape. // *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, v. 10, p. 6741–6750.
50. Olivieri J. R., Craievich A. F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle x-ray scattering. // *Eur. Biophys. J.*, 1995, v. 24, p. 77–84.
51. Togashi D. M., Ryder A. G., Mc Mahon D., Dunne P., McManus J. Fluorescence study of Bovine Serum Albumin and Ti and Sn Oxide Nanoparticles Interactions. // *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV*, eds. D. Schweitzer, M. Fitzmaurice. *Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics*, SPIE, 2007, V. 6628, 66281K.