

А.И. Рабаданова, Д.М. Багатмурзаева, В.Р. Абдуллаев, Т.Р. Ражабканиева

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ И ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ПРИ СТАРЕНИИ И УПОТРЕБЛЕНИИ НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, Россия

Проведено сравнительное исследование конформационных изменений белков плазмы и эритроцитов крови людей различных возрастных групп и лиц, употребляющих наркотики. Обнаруженные фазные изменения общей и триптофановой флуоресценции белков плазмы и мембран эритроцитов крови у пожилых людей и наркозависимых указывают на увеличение доступности триптофановых остатков к водному окружению в результате конформационных перестроек макромолекул и дезорганизацию липидного слоя из-за интенсификации свободнорадикальных процессов.

Ключевые слова: белки плазмы крови, белки эритроцитов, триптофан, тирозин, флуоресценция

COMPARATIVE STUDY OF THE FLUORESCENCE SPECTRUM OF PLASMA PROTEINS AND RED BLOOD CELLS OF BLOOD IN AGING AND DRUG ADDICTION

A.I. Rabadanova, D.M. Bamatmurzaeva, V.R. Abdullaev, T.R. Razhabkadiyeva

Dagestan State University, Makhachkala, Russia

Aging is accompanied by intensification of oxidative degradation of proteins, including lipoproteins, proteolytic system dysfunction and accumulation of oxidized proteins. Similar changes are found in drug addiction. In this regard, we carried out a comparative study of conformational changes of plasma proteins and red blood cells of people of different age groups and people who use drugs. The study was carried out with the use of fluorescence analysis to measure the spectra of fluorescence of amino acid residues in proteins (summary fluorescence and tryptophan). In the analysis of fluorescence spectra it is preferable to use the second derivative of the fluorescence spectra as it is the most informative. The application of this research method was chosen because it has high sensitivity. It provides information on the status of living systems without damaging them; it requires large quantities of biological material; it makes it possible to differentiate between the various stages of the disease. Changes in the general phase and tryptophan fluorescence plasma proteins in older people and drug addicts indicate increase in the availability of tryptophan residues to the aqueous environment as a result of conformational changes of macromolecules and the disruption of the lipid layer due to the intensification of free radical processes.

Key words: blood plasma proteins, erythrocyte proteins, tryptophan, tyrosine, fluorescence

ВВЕДЕНИЕ

Процессы свободнорадикального окисления, определяя адаптивную состоятельность организма к действию патологических факторов, являются необходимым звеном жизнедеятельности клеток, с одной стороны, и выступают как универсальное неспецифическое звено механизмов развития многих патологических процессов, с другой [1, 4, 5]. Одной из общепризнанных гипотез естественного старения организма является свободнорадикальное окисление биомолекул. Сходные изменения происходят и в молодом организме в условиях действия наркотических веществ. В этой связи актуальным представляется рассмотрение наркотической зависимости в качестве модели ускоренного старения организма.

Известно, что в процессе старения организма и связанных с ним различных заболеваний наблюдается интенсификация окислительной деструкции белков, в том числе и липопротеинов, нарушение функции протеолитической системы, что приводит к накоплению агрегатов окисленных белков [3]. Наиболее чувствительными к окислению являются серосодержащие (метионин, цистеин) и ароматические (гистидин, триптофан, тирозин и фенилаланин) аминокислотные остатки белков. Однако селектив-

ное повреждение этих лабильных аминокислотных остатков и механизм их окисления зависят от природы активных форм кислорода.

В связи с этим **целью** данной работы явилось сравнение конформационных изменений белковых молекул при старении и действии наркотических веществ с использованием метода флуоресцентного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте принимали участие по 50 человек разных возрастных групп: 5–8 лет (дети), 19–22 года (подростки) и 70–80 лет (люди старческого возраста), – а также 50 лиц в возрасте 25–35 лет, страдающих наркозависимостью.

Исследования проводились на базе отделения наркологии Центральной клинической больницы и Геронтологического центра г. Махачкалы, кафедр зоологии и физиологии и биохимии и биофизики ДГУ.

Спектральный анализ белков плазмы и мембран эритроцитов крови проводили на спектрофлуориметре Hitachi F7000 и сканирующем спектрофотометре Beckman Coulter DU730. Были сняты спектры суммарной (фенилаланин, тирозин, триптофан, $\lambda_{\text{возб.}} = 280 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{регистр.}} = 295\text{--}450 \text{ нм}$) и триптофановой

($\lambda_{\text{возб.}} = 295 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{регистр.}} = 315\text{--}450 \text{ нм}$) флуоресценции белков. Полученные спектры флуоресценции были подвергнуты преобразованию Фурье с вычислением вторых производных (2ПДФ) с использованием пакета программы OriginPro 8.6 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены спектры поглощения и собственной флуоресценции белков плазмы крови и их вторые производные. Полученные вторые производные спектров поглощения позволяют определить характеристики индивидуальных полос.

Как видно из рисунка 1, во вторых производных спектров поглощения выявлены характеристики индивидуальных полос с отрицательными максимумами для плазмы – 210, 220–225 и 280 нм, для эритроцитов крови – 200, 227 и 275 нм.

Поглощение света белками в области 240–300 нм обусловлено главным образом ароматическими аминокислотами – триптофаном, тирозином и фенилаланином.

Полученные нами результаты вторых производных спектров поглощения белков указывают на

различия в содержание аминокислот в составе белков плазмы и эритроцитов крови людей различных возрастных групп.

Анализ спектров собственной флуоресценции белков плазмы наркозависимых и людей различных возрастных групп (рис. 3) при $\lambda_{\text{возб.}} = 280 \text{ нм}$ показал, что все исследуемые образцы имели аналогичную форму спектра с максимумом при 335 нм, что характерно для хромофорных аминокислотных остатков белков (в основном триптофана).

Следует отметить, что, в отличие от белков плазмы, максимумы интенсивности флуоресценции белков мембран эритроцитов крови (графики не представлены в статье) имеют сдвиг в коротковолновую область. Это указывает на то, что триптофановые остатки в мембранных белках характеризуются крайне гидрофобным состоянием с максимумом флуоресценции, равным 330–333 нм.

Как видно из рисунка 3, интенсивность суммарной и триптофановой флуоресценции белков плазмы и мембран эритроцитов крови при $\lambda_{\text{макс.}}$ выше в юношеском возрасте, при этом минимальные значения наблюдаются у пожилых и лиц, употребляющих наркотические вещества.

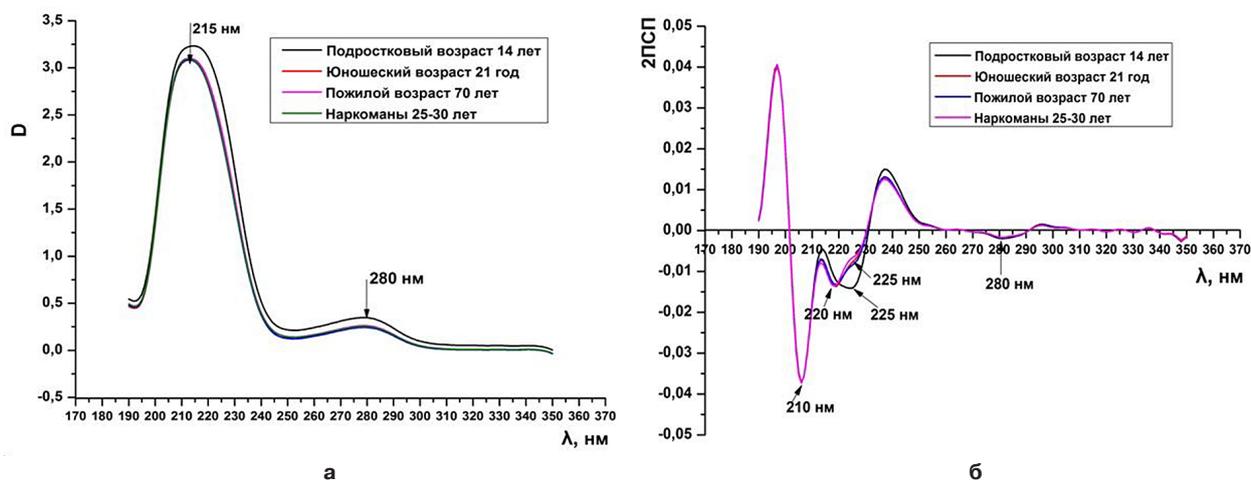


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и вторые производные спектров поглощения (б) плазмы крови наркозависимых и людей различных возрастных групп в ультрафиолетовой области спектра.

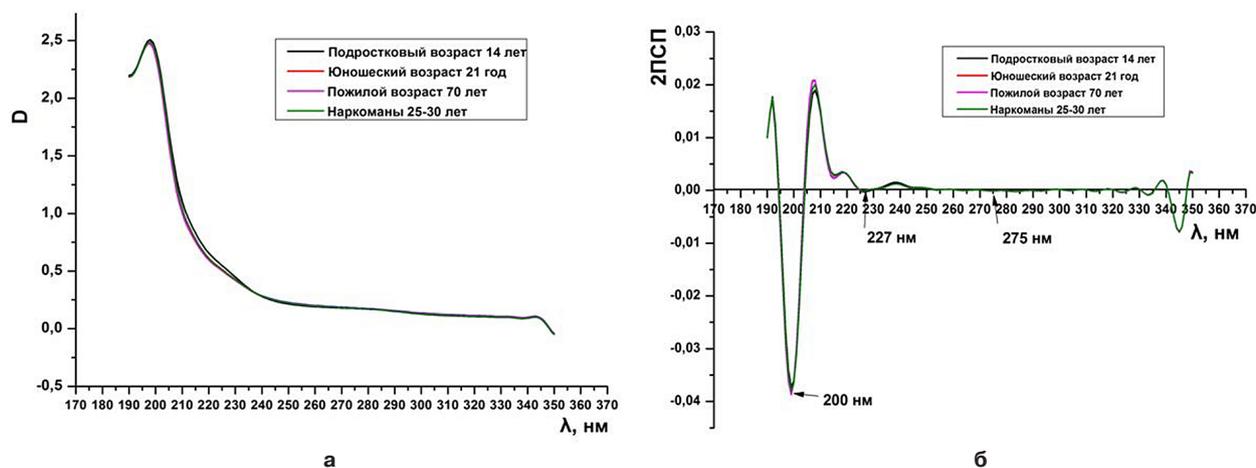


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и вторые производные спектров поглощения (б) мембран эритроцитов крови наркозависимых и людей различных возрастных групп в ультрафиолетовой области спектра.

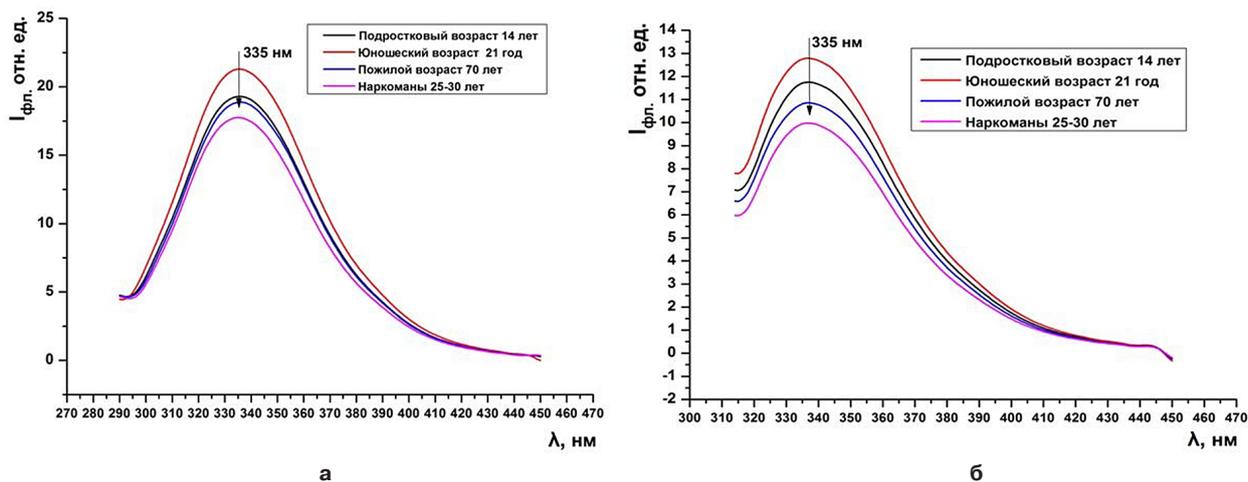


Рис. 3. Спектры суммарной ($\lambda_{\text{взб.}} = 280 \text{ нм}$) (а) и триптофановой ($\lambda_{\text{взб.}} = 295 \text{ нм}$) (б) флуоресценции плазмы крови наркоманов и людей различных возрастных групп.

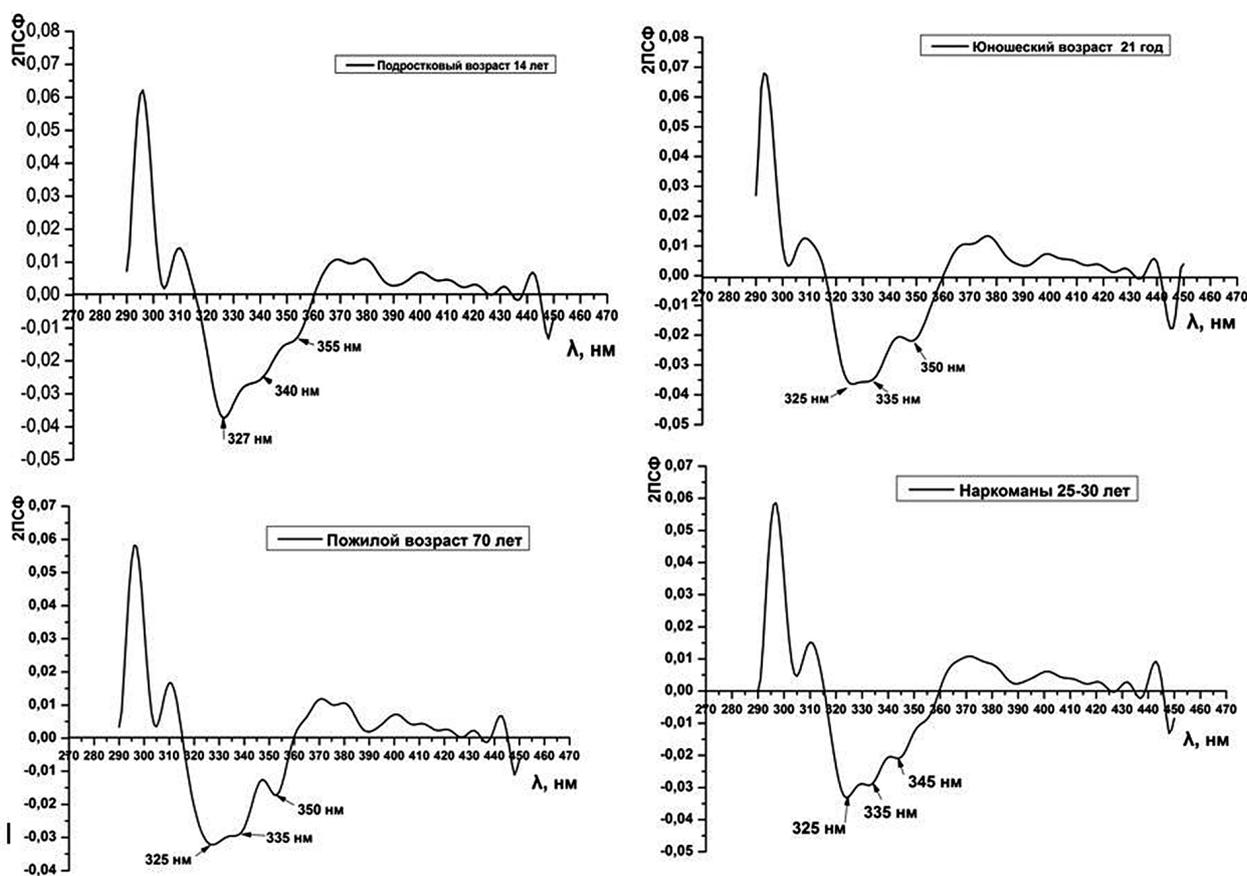


Рис. 4. Вторые производные спектров суммарной флуоресценции белков плазмы крови наркоманов и людей различных возрастных групп.

При анализе спектров флуоресценции предпочтительно применять вторые производные спектров флуоресценции (2ПСФ) как наиболее информативные. Использование 2ПСФ оправдано тем, что они, по сравнению с исходными спектрами, дают возможность получить более детальную информацию о состоянии микроокружения ароматических остатков белков, а в ряде случаев также и разделить вклад тирозиновой и триптофановой составляющих в суммарный спектр. Последнее обстоятельство обу-

словлено тем, что СФ триптофана имеют значительно большую полуширину, в сравнении со спектрами флуоресценции тирозина, и положение их максимумов по исходным спектрам может быть определено менее точно, чем в случае спектров. Поэтому анализ 2ПСФ особенно актуален для анализа СФ белков, флуоресценция которых обусловлена преимущественно триптофановыми остатками.

Вторые производные спектров суммарной флуоресценции белков плазмы крови людей различных

возрастных групп указывают на преобладающий вклад триптофановых остатков в суммарную флуоресценцию (рис. 4). Об этом свидетельствует положение отрицательно пика при 325–355 нм. Интересен тот факт, что в спектрах вторых производных суммарной флуоресценции белков плазмы крови пожилых людей и людей, использующих наркотические вещества, исчезают пики на 350–355 нм. Это свидетельствует об конформационных изменениях белковых молекул, связанных с окислением триптофановых остатков на поверхности глобулы как более доступных к деструктивным факторам.

При этом известно, что наличие отрицательного максимума во 2ПСФ 350–355 нм может быть отнесено к триптофановым остаткам, полностью доступным водному окружению [2, 6].

У трех групп людей (дети, подростки, лица пожилого возраста) в спектрах вторых производных триптофановой флуоресценции наблюдаются отрицательные пики при $\lambda_{\text{макс}}$ 326, 335, 345, 355 нм (рис. 5). В то же время у пожилых людей и наркоманов исчезает пик при $\lambda_{\text{макс}} = 345,355$ нм, но появляется новый пик при $\lambda_{\text{макс}} = 348$ нм. Это подтверждает факт конформационных изменений белковых молекул: потерю легко доступных полярным растворителям триптофановых остатков ($\lambda_{\text{макс}} = 355$ нм) и выход к поверхности глобулы глубь лежащих остатков триптофана (смещение пика $\lambda_{\text{макс}}$ с 345 нм на 348 нм).

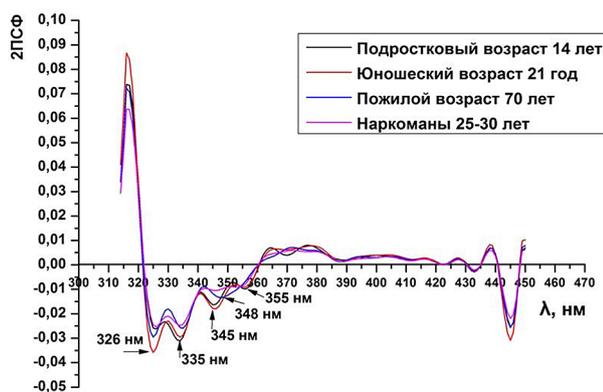


Рис. 5. Вторые производные спектров триптофановой флуоресценции плазмы крови наркоманов и людей различных возрастных групп.

Таким образом, резюмируя все вышеизложенное, можно констатировать, что различными методами, в том числе и флуоресцентной спектроскопией, мы выявили значимые изменения в белках плазмы и мембран эритроцитов крови людей различных возрастных групп, которые выражались в падении интенсивности флуоресценции и окислении поверхностных триптофанилов. Появление и исчезновение отрицательных пиков в 2ПСФ в длинноволновой области указывает не только на увеличение доступности триптофановых и тирозиновых остатков к водному окружению, но и на дезорганизацию липидного слоя из-за интенсификации свободнорадикальных процессов.

ЛИТЕРАТУРА | REFERENCES

1. Бжахова Ф.К., Нагоев Б.С. Состояние свободнорадикальных процессов у больных сифилисом на примере церулоплазмينا // *Фундаментальные исследования*. – 2005. – № 9. – С. 79.
Bzhakhova FK, Nagoev BS (2005). Status of free radical processes in patients with syphilis through the example of ceruloplasmin [Sostoyanie svobodnoradikal'nykh protsessov u bol'nykh sifilisom na primere tseruloplazmina]. *Fundamental'nye issledovaniya*, (9), 79.
2. Бурштейн Э.А. Люминисценция ароматических аминокислот и белков в растворах при возбуждении ультрафиолетовой области // *Биофизика*. – 1961. – Т. 6, № 6. – С. 753–763.
Burstein EA (1961). Luminescence of aromatic amino acids and proteins in solutions under stimulation of ultraviolet spectrum [Lyuministsentsiya aromaticheskikh aminokislot i belkov v rastvorakh pri возбуждении ультрафиолетовой области]. *Бифизика*, 6 (6), 753-763.
3. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. – СПб., 2006. – 397 с.
Dubinina EE (2006). Oxygen metabolites in the functional activity of the cells [Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok], 397.
4. Каблахова Ю.О., Маржохова М.Ю. Состояние Т-клеточного иммунитета и содержание малонового диальдегида у больных острой дизентерией Флекснера // *Вопросы теоретической и клинической медицины*. – Нальчик, 2004. – С. 27.
Kablakhova YO, Marzhokhova MY (2004). The state of T-cell immunity and the content of malondialdehyde in patients with acute Flexner dysentery [Sostoyanie T-kletochnogo immuniteta i sodержание malonovogo dial'degida u bol'nykh ostroy dizenteriey Fleksnera]. *Voprosy teoreticheskoi i klinicheskoi mediciny*, 27.
5. Камбачокова З.А. Состояние тиолдисульфидного звена антиоксидантной системы крови у здоровых людей // *Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектива 2009»*. – Нальчик, 2009. – Т. 6. – С. 39–43.
Kambachokova ZA (2009). State of thiol disulfide link of the antioxidant blood system in healthy people [Sostoyanie tioldisul'fidnogo zvena antioksidantnoy sistemy krovi u zdorovykh lyudey]. *Materialy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh «Perspektiva 2009»* (6), 39-43.
6. Конев С.В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. – Минск: Наука и техника, 1965. – 184 с.
Konev SV (1965). Electronically stimulated biopolymer conditions [Elektronno-vozbuzhdennye sostoyaniya biopolimerov], 184.
7. Dodge GT (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (100), 119-130.

Сведения об авторах
Information about the authors

Рабданова Аминат Ибрагимовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и физиологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет» (367010, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а, тел.: 8 (8722) 56-21-14; e-mail: ashty06@mail)

Rabadanova Aminat Ibragimovna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Zoology and Physiology of Dagestan State University (367010, Makhachkala, M. Gadjiev str., 43a; tel.: +7 (8722) 56-21-14; e-mail: ashty06@mail)

Бамматмурзаева Джамия Магомедсаидовна – старший лаборант кафедры зоологии и физиологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет» (e-mail: djamka_90@mail.ru)

Vammatmurzaeva Dzhamilya Magomedsaidovna – Senior Assistant of the Department of Zoology and Physiology of Dagestan State University (e-mail: djamka_90@mail.ru)

Абдуллаев Вагаб Рафикович – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и физиологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет» (e-mail: vagab@mail.ru)

Abdullaev Vagab Rafikovich – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Zoology and Physiology of Dagestan State University (e-mail: vagab@mail.ru)

Ражабкадиева Таисат Рашидовна – магистрант кафедры зоологии и физиологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет» (e-mail: taisa.20.94@mail.ru)

Razhabkadiyeva Taisat Rashidovna – Master's Degree Student of the Department of Zoology and Physiology of Dagestan State University (e-mail: taisa.20.94@mail.ru)