

СИСТЕМА ФЕНТОНА И ОЗОН В ИНДУЦИРОВАННОМ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ АЛЬБУМИНА И ФИБРИНОГЕНА

**Горобец М.Г., Бычкова А.В., Сульимова Н.Б., Константинова М.Л.,
Леонова В.Б., Розенфельд М.А.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской
академии наук, Москва, Россия*

e-mail: maria.g.gorobets@gmail.com, markrosenfeld@rambler.ru

Белки, циркулирующие в плазме крови, являются мишенями для активных форм кислорода (АФК). Цель данной работы – изучение модификации бычьего сывороточного альбумина (БСА) и фибриногена (ФГ) в модельных системах под действием озона и системы Фентона (сФ) – смеси пероксида водорода и соли железа (II).

Известно, что ФГ в 20 раз более чувствителен к окислительной модификации, чем другие основные белки плазмы – альбумин, иммуноглобулины, трансферрин [1]. Относительно альбумина известна его способность перехватывать около 80% АФК плазмы крови, что позволяет рассматривать альбумин как белковый антиоксидант и как биологический маркер патологического окислительного стресса [2]. Генерация свободных радикалов оценивалась с помощью селективных ловушек – о-фенилендиамина (о-ФДА), продукт окислительной модификации которого имеет максимум поглощения на 420–455 нм, а также с использованием терефталевой кислоты (ТФК) и соли (ТФС), образующих при взаимодействии с гидроксильными радикалами и феррильными ионами флуоресцирующие продукты – гидрокситерефталаты.

Проведена оценка влияния продолжительности инкубации образцов (БСА, ФГ, ТФК, ТФС, системы «белок + ТФС/ТФК») с источниками генерации АФК на спектры флуоресценции белков и продукта окисления ТФК/ТФС. Исследован эффект тушения флуоресценции триптофана белков при добавлении сФ, установлено, что его причиной является связывание белками ионов железа [3]. При окислении озоном падение флуоресценции триптофана белка – следствие окисления молекулярным озоном. Проанализировано изменение спектров триптофана белка в зависимости от количества озона (рис. 1). Показано образование битирозино-

вых сшивок внутри молекул белков при индуцированном окислении (рис. 1) [4].

Методом ИК-спектроскопии продемонстрирована способность ТФК и ТФС осуществлять перехват гидроксильных радикалов в модельных системах индуцированного окисления, содержащих белок (рис. 2), в случае действия на белки озона [4].

Количество образующегося OH^* , оцениваемого по спектрам флуоресценции окисленных продуктов ТФК/ТФС выше, чем при окислении сФ при равной модификации триптофана белков. Изменение pH (с 7,3 до 6,7) не оказывает воздействия на модификацию триптофана ФГ под действием сФ; при окислении озоном приводит к большей окислительной модификации, обусловленной различным количеством генерируемых АФК.

Проведена оценка влияния растворителя (воды, фосфатного и Трис–HCl буфера), концентрации и соотношения компонентов сФ, продолжительности инкубации железа (II) с белками, растворителем и о-ФДА на кинетику генерации свободных радикалов под действием сФ.

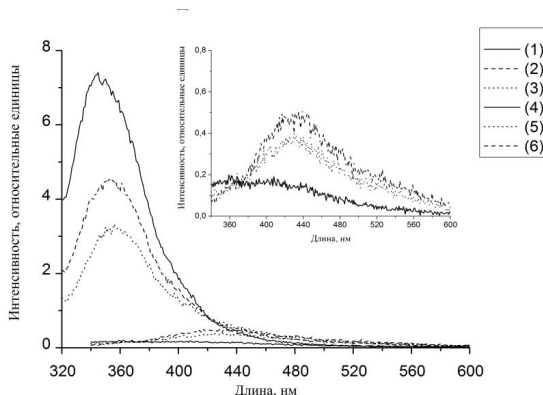


Рис. 1. Спектры флуоресценции, регистрируемые для образцов (волна возбуждения 310, 320 нм): 1,2,3 – триптофан ФГ (2,9 нМ), окисленного $0, 0,2 \cdot 10^{-7}, 0,6 \cdot 10^{-7}$ моль O_3 , соответственно; 4,5,6 – битиризинов ФГ (2,9 нМ), окисленного теми же количествами O_3 .

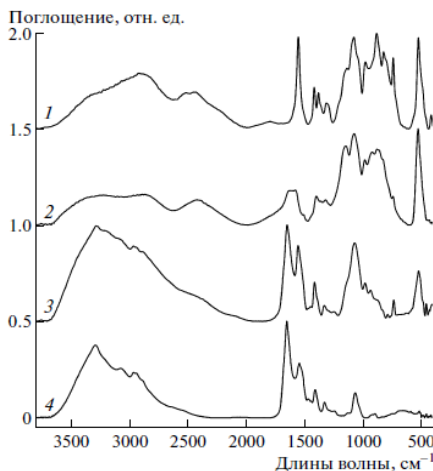


Рис. 2. ИК-спектры компонентов реакции: 1, 2 – спектр неокисленной ТФК ($1,9 \cdot 10^{-3}$ М) и окисленной озоном ТФК, соответственно, 3 – спектр фибриногена ($5,9 \cdot 10^{-6}$ М), окисленного в присутствии ТФК ($1,9 \cdot 10^{-3}$ М), 4 – спектр фибриногена ($5,9 \cdot 10^{-6}$ М), окисленного в отсутствие ТФК.

Проделанная работа поднимает методологическую проблему описания окислительной модификации белков под действием сФ. Причиной модификации белков признаются свободнорадикальные процессы, а тот факт, что белки способны вступать во взаимодействие с ионами железа, и это взаимодействие может предопределять протекание процесса окисления, часто оказывается вне поля зрения исследователей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 16-34-60244 мол_а_дк и № 15-33-70019 «мол_а_мос».

Литература

1. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay / E. Shacter [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – Vol. 17 – P. 429–437.
2. Antioxidant properties of serum albumin / M. Roche [et al.] // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582 – P. 1783–1787.
3. Oxygen-dependent oxidation of Fe(II) to Fe(III) and interaction of Fe(III) with bovine serum albumin, leading to a hysteric effect on the fluorescence of bovine serum albumin / X. Xu [et al.] // *J. Fluores.* – 2008 – Vol. 18 (1) – P. 193-201.

4. Усиление роли D:D взаимодействий в самосборке фибрина при окислении / М.А.Розенфельд [и др.] // Докл. Акад. Наук. – 2016. – Т. 466, №2 – С. 233–236.
5. Природа активных промежуточных частиц в процессах индуцированного озонном окисления фибриногена / М.А. Розенфельд [и др.] // Докл. Акад. Наук. – 2015. – Т. 461, №6 – С. 729–732.

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА С ШУНГИТОВЫМ УГЛЕРОДОМ В ВОДНЫХ НАНО- ДИСПЕРСИЯХ

Горюнов А.С., Рожков С.П., Суханова Г.А.

*ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН,
г.Петрозаводск, Россия*

Понимание фундаментальных взаимодействий новых ультратонких форм углерода с биологическими молекулами, тканевыми структурами и целыми организмами является первоочередным как с точки зрения биомедицинских приложений, так и охраны окружающей среды. В ряду углеродосодержащих материалов, которые преобладают среди наноматериалов, встречающихся в окружающей среде, шунгитовый наноуглерод (ShC) представляет собой один из ярких примеров [1], поскольку он весьма специфичен, довольно широко распространен и активно внедряется в различные биоактивные продукты не всегда с достаточным обоснованием. Важным обстоятельством, сложившимся в исследованиях ShC и его свойств в самое последнее время, является то, что все больше данных говорят о его принадлежности графеновому семейству [1]. Особенности механизма биоактивности ShC малоизучены и недостаточно понятны в отношении роли, которую играет наноуглерод, высвобождаемый непосредственно из шунгитовой породы в результате взаимодействия с водой. В связи с этим мы исследовали эффекты взаимодействия ShC с сывороточными альбуминами в водной нанодисперсии на предмет фракционного состава и структуры белка методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Термодинамические свойства коммерческого необезжиренного сывороточного альбумина (СА) человека и быка изучались в водных нанодисперсиях ShC при концентрациях белка <1, 5 и 10 г/л с помощью микрокалориметра NanoDSC (TA-Instruments). Использовались полученные