

УДК 535.34:535.371

ОСОБЕННОСТИ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДИСЛИПИДЕМИЕЙ¹

**Е. В. КОРОЛИК¹⁾, М. В. ГОЛЬЦЕВА¹⁾,
В. А. ЖУКОВСКАЯ¹⁾, Г. Г. ЛУБНЕВСКАЯ¹⁾, А. А. ИВАНОВ¹⁾**

¹⁾Белорусский государственный медицинский университет,
пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь

Проведен анализ ИК-спектров плазмы крови здоровых доноров, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Установлено, что структура основного транспортного белка плазмы крови – альбумина – в плазме крови пациентов с инфарктом мозга, пациентов с ИБС и представителей контрольной группы практически одинакова. Показано, что при отсутствии изменений во вторичной и третичной структуре альбумина повышение связывания анионных гидрофобных метаболитов в плазме крови пациентов с дислипидемией по сравнению с контролем обусловлено структурными изменениями в липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП).

Ключевые слова: ИК-спектроскопия; метод флуоресцентного зондирования; дислипидемия; альбумин; липопротеины низкой плотности; липопротеины очень низкой плотности.

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Королик ЕВ, Гольцева МВ, Жуковская ВА, Лубневская ГГ, Иванов АА. Особенности инфракрасных спектров плазмы крови пациентов с дислипидемией. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2021;1:106–111. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-106-111>

For citation:

Korolik EV, Goltseva MV, Zhukovskaya VA, Lubnevskaya GG, Ivanov AA. Features of infrared spectra of blood plasma of patients with dyslipidemia. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;1:106–111. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-106-111>

Авторы:

Елена Викторовна Королик – кандидат физико-математических наук; доцент кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Марина Владимировна Гольцева – старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Вера Алексеевна Жуковская – старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Галина Григорьевна Лубневская – старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Александр Аркадьевич Иванов – кандидат физико-математических наук; доцент кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Authors:

Elena V. Korolik, PhD (physics and mathematics); associate professor at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

elena_korolik@mail.ru

Marina V. Goltseva, senior lecturer at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

mgoltseva@yandex.ru

Vera A. Zhukovskaya, senior lecturer at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

vera49@tut.by

Galina G. Lubnevskaya, senior lecturer at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

l_gala@tut.by

Alexander A. Ivanov, PhD (physics and mathematics); associate professor at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

ivanovphysics@gmail.com

FEATURES OF INFRARED SPECTRA OF BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH DYSLIPIDEMIA

*E. V. KOROLIK^a, M. V. GOLTSEVA^a,
V. A. ZHUKOVSKAYA^a, G. G. LUBNEVSKAYA^a, A. A. IVANOV^a*

^aBelarusian State Medical University, 83 Dzierżyński Avenue, Minsk 220116, Belarus

Corresponding author: E. V. Korolik (elena_korolik@mail.ru)

The paper analyzes the IR spectra of blood plasma from healthy donors, patients with brain infarction and patients with coronary heart disease (CHD). It was found that the structure of the main transport protein of blood plasma – albumin – in the blood plasma of patients with brain infarction, patients with CHD and representatives of the control group is almost identical. It is shown that in the absence of changes in the secondary and tertiary structure of albumin, the increase in binding of anionic hydrophobic metabolites in the blood plasma of patients with dyslipidemia compared to control is due to structural changes in low-density lipoproteins (LDL) and very low-density lipoproteins (VLDL).

Keywords: IR spectroscopy; fluorescence sensing; dyslipidemia; albumin; low-density lipoproteins; very low-density lipoproteins.

Введение

В настоящее время метод инфракрасной (ИК) спектроскопии благодаря существенному повышению его аналитических возможностей в результате использования ИК фурье-спектрометров находит все большее применение в медико-биологических исследованиях, например для компонентного анализа плазмы крови и структуры входящих в ее состав белков, диагностики на этой основе различных заболеваний [1–3]. В последние годы возрастает интерес к структуре и метаболизму липидов в организме. Атеросклероз является причиной наиболее серьезных сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ишемической болезни сердца (ИБС), которая может привести к развитию инфаркта миокарда, а также инфаркту головного мозга [4]. На долю основных сердечно-сосудистых заболеваний, вызываемых атеросклерозом, в целом приходится примерно половина смертных случаев среди взрослого населения. Поэтому любая дополнительная информация о структурно-функциональном состоянии основных транспортных систем плазмы крови у пациентов с дислипидемией позволит более четко подойти к вопросу коррекции нарушений липидного обмена, которая является актуальной задачей практической медицины.

Цель данной работы – анализ ИК-спектров плазмы крови здоровых доноров, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ИБС для подтверждения наличия или отсутствия возможных конформационных изменений молекул альбумина в плазме крови пациентов с дислипидемией разного генеза.

Материалы и методы исследования

В работе использовалась плазма крови здоровых доноров (контрольная группа, $n = 34$); пациентов с лакунарным инфарктом головного мозга и дислипидемией ($n = 22$); пациентов с ИБС и дислипидемией ($n = 21$). Забор образцов крови производился утром натощак. В качестве консерванта применялся гепарин. Кровь, взятую из периферической вены, помещали в стеклянную пробирку с гепарином (10 МЕ на 1 мл крови) и центрифугировали для сепарации плазмы и клеток (2500 об/мин, 15 мин). Плазму отбирали в пластиковые тубы и замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для всех исследованных образцов плазмы пациентов с дислипидемией был выполнен биохимический анализ крови на содержание альбумина, общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеинов различной плотности, а для образцов контрольной группы – только альбумина.

Для проведения ИК-спектроскопических исследований плазмы крови пациентов с дислипидемией были получены тонкие пленки на поверхности оптических окон из кристаллов KRS-5 путем нанесения дозированного количества разбавленной плазмы. Пленки формировались при комнатной температуре в течение 24 ч. ИК-спектры в области частот $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ регистрировались на ИК фурье-спектрометре (Nicolet Analytical Instruments, США) при спектральном разрешении 2 см^{-1} и числе сканирований 256, при этом прибор постоянно продували сухим воздухом.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было проведено исследование связывающей способности альбумина и липопротеинов у пациентов с ИБС и лакунарным инфарктом головного мозга методом флуоресцентного зондирования. Оно показало повышение связывания анионного флуоресцентного зонда 8-анилинонафталин-1-

сульфоната (АНС) в плазме крови пациентов по сравнению с контролем [5; 6]. Все пациенты с дислипидемией были разделены на две группы в зависимости от основного диагноза. К первой группе отнесены пациенты с диагнозом «лакунарный инфаркт головного мозга», ко второй – «ИБС». Альбумин является главным транспортным белком, связывающим анионный флуоресцентный зонд АНС в плазме крови. Интенсивность флуоресценции этого зонда зависит от концентрации альбумина в плазме крови, его загруженности лигандами, а также от конформационных изменений белка, приводящих к появлению дополнительных центров связывания [6]. Для получения более объективных данных нами был использован флуоресцентный параметр ($I_{\text{АНС}}/C_{\text{САЧ}}$) – интенсивность флуоресценции зонда АНС, нормированная на единицу концентрации сывороточного альбумина человека (САЧ). Флуоресцентный параметр $I_{\text{АНС}}/C_{\text{САЧ}}$, характеризующий связывающую способность альбумина плазмы крови по отношению к анионным гидрофобным метаболитам, у пациентов первой группы превысил аналогичный параметр для здоровых доноров на 29 %, а у пациентов второй группы – на 49 %. В таблице приведены средние значения концентрации альбумина для контрольной группы, исследуемых пациентов с лакунарным инфарктом головного мозга и ИБС. Из таблицы видно, что при данных патологиях в плазме крови наблюдается существенное уменьшение содержания альбумина (на 23,0 и 29,5 % соответственно) по сравнению с его концентрацией у контрольной группы.

Средние значения биохимических показателей
плазмы крови здоровых доноров и пациентов с инфарктом мозга и ИБС
Averages of biochemical indicators in blood plasma of healthy donors
and patients with brain infarction and coronary heart disease

Биохимические показатели	Здоровые доноры ($n = 34$)	Пациенты с инфарктом мозга ($n = 22$)	Пациенты с ИБС ($n = 21$)
Концентрация альбумина, г/л	$44,00 \pm 1,42$	$34,00 \pm 1,42^*$	$31,40 \pm 1,42^*$
Суммарное содержание ЛПНП и ЛПОНП, ммоль/л	<3,00 (норма)	$4,08 \pm 0,12^*$	$4,65 \pm 0,14^*$

* Различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Для подтверждения наличия или отсутствия возможных конформационных изменений молекул альбумина в плазме крови пациентов с дислипидемией были получены и проанализированы ИК-спектры пленок плазмы крови контрольной группы, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ИБС с различным уровнем липопротеинов, которые представлены на рис. 1. Для пациентов с инфарктом мозга содержание ЛПНП и ЛПОНП составило 3,67 ммоль/л (кривая 2), а для пациентов с ИБС – 4,32 и 6,78 ммоль/л (кривые 3 и 4) соответственно. В интервале $1700\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ наблюдаются полосы, известные в литературе как полосы поглощения Амид I, Амид II и Амид III [1; 2; 7]. Самая интенсивная полоса с максимумом при 1651 см^{-1} (Амид I) обусловлена валентными колебаниями групп $\text{C}=\text{O}$ полипептидных цепей. Полосы поглощения с максимумом при 1545 см^{-1} (Амид II) определяются в основном деформационными колебаниями пептидных NH -групп и боковыми группами некоторых аминокислот. В интервале частот $1350\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ проявляются полосы деформационных колебаний NH -групп и валентных колебаний CN -групп полипептидного остова (Амид III) [1; 2]. Полосы Амид I, Амид II и Амид III чувствительны к изменению вторичной и третичной структуры белков [1; 2; 7].

В рассматриваемых ИК-спектрах (см. рис. 1) в области частот $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ наблюдаются четыре перекрывающиеся полосы поглощения малой интенсивности с максимумами при 2957; 2927; 2873 и 2854 см^{-1} . Полосы при 2957 и 2873 см^{-1} обусловлены асимметричными и симметричными валентными колебаниями CH_3 -групп соответственно, а полосы при 2927 и 2854 см^{-1} – асимметричными и симметричными валентными колебаниями CH_2 -групп.

На рис. 2 представлены ИК-спектры пленок плазмы крови контрольной группы, альбумина, ЛПНП и ЛПОНП. Спектр пленки альбумина (см. рис. 2, кривая 2) практически идентичен спектру пленки плазмы крови донора контрольной группы (см. рис. 2, кривая 1). Это объясняется тем, что основными компонентами плазмы крови (за вычетом воды и растворенных неорганических солей) являются белки, из которых свыше 50 % приходится на альбумин. ИК-спектры липопротеинов (кривые 3 и 4) резко отличаются от спектров альбумина (кривая 2) и плазмы крови (кривая 1) наличием высокоинтенсивных полос валентных колебаний CH_2 -группы при 2924 и 2854 см^{-1} и полосы валентных колебаний карбонильной группы при 1736 см^{-1} . Эти полосы обусловлены липидной составляющей липопротеинов [3; 7].

Высокая интенсивность полос поглощения CH_2 -групп в ИК-спектрах липопротеинов при сравнительно небольшой интенсивности этих полос в ИК-спектрах белков делает область $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ наиболее подходящей для анализа уровня липопротеинов в плазме крови.

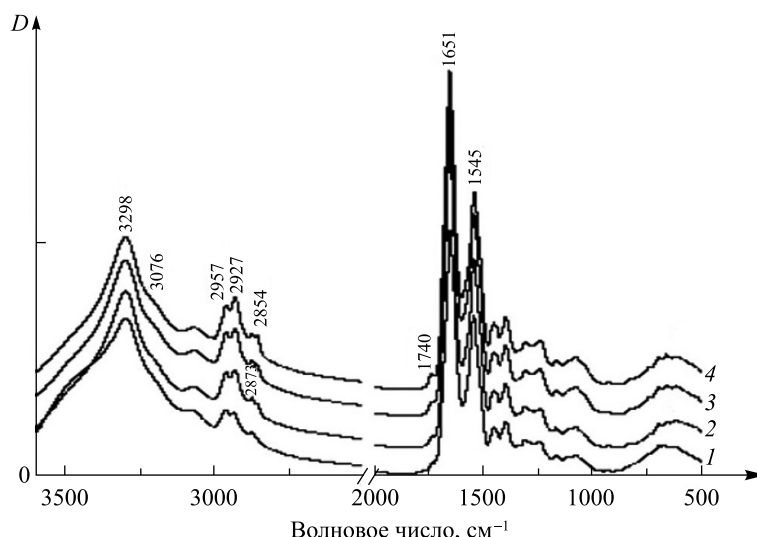


Рис. 1. ИК фурье-спектры пленок плазмы крови контрольной группы (1), пациентов с инфарктом мозга (2) и ИБС (3, 4) в области частот 3600–500 cm^{-1} (для наглядности спектры смещены по оси ординат)

Fig. 1. IR Fourier spectrums of blood plasma films of the control group (1), patients with brain infarction (2) and coronary heart disease (3, 4) in the area of frequencies 3600–500 cm^{-1} (spectra are shifted along the ordinate for clarity)

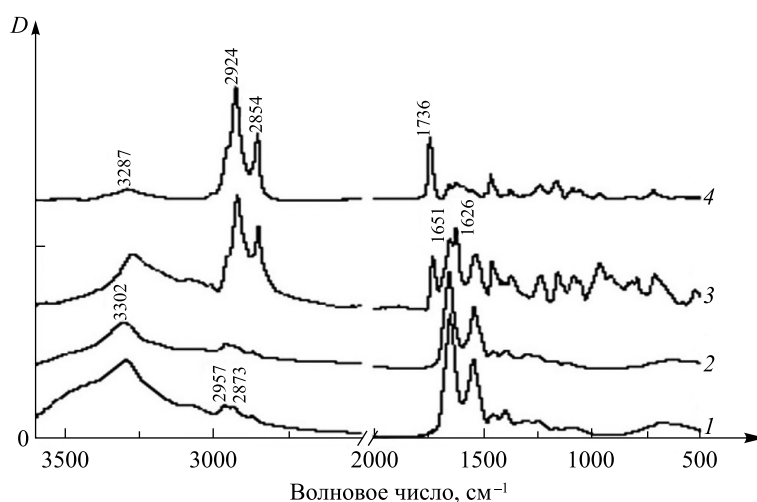


Рис. 2. ИК фурье-спектры пленок плазмы крови контрольной группы (1), альбумина (2), ЛПНП (3) и ЛПОНП (4) в области частот 3600–500 cm^{-1} (для наглядности спектры смещены по оси ординат)

Fig. 2. IR Fourier spectrums of blood plasma films of the control group (1), albumin (2), LDL (3) and VLDL (4) in the area of frequencies 3600–500 cm^{-1} (spectra are shifted along the ordinate for clarity)

Сравнительный анализ ИК-спектров плазмы крови контрольной группы (см. рис. 1, кривая 1), пациентов с инфарктом мозга (см. рис. 1, кривая 2) и пациентов с ИБС (см. рис. 1, кривые 3 и 4) показал, что отличия в исследуемых образцах плазмы крови наблюдаются только в областях 3000–2800 и 1800–1700 cm^{-1} , которые обусловлены липидной составляющей липопротеинов. Форма контура, положение максимумов и относительные интенсивности полос Амид I (1651 cm^{-1}), Амид II (1545 cm^{-1}) и Амид III (интервал частот 1350–1200 cm^{-1}) практически такие же, как в спектре плазмы крови контрольной группы (см. рис. 1, кривая 1). Так как полосы Амид I, Амид II и Амид III чувствительны к изменению вторичной и третичной структуры белков [1; 2], то это может означать, что структура белков, в частности альбумина, в плазме крови пациентов с инфарктом мозга, пациентов с ИБС и доноров контрольной группы практически одинакова. Это свидетельствует об отсутствии возможности появления дополнительных связывающих центров на данном транспортном белке. Функциональная активность

альбумина в этом случае должна либо оставаться в норме, либо снижаться за счет избыточного накопления отрицательно заряженных гидрофобных метаболитов. Однако, по данным флуоресценции зонда АНС, связывающая способность плазмы крови обеих групп пациентов по отношению к отрицательно заряженным гидрофобным метаболитам существенно повышается, несмотря на снижение концентрации альбумина.

Известно [5; 6], что анионный зонд АНС в плазме крови взаимодействует в основном с молекулами альбумина, но может реагировать и на поверхностный заряд липидных структур. При атеросклерозе в атерогенных липопротеинах плазмы крови происходят структурные изменения, выражающиеся в увеличении размеров ЛПОНП, появлении дополнительных положительно заряженных групп на поверхности ЛПНП и ЛПОНП, а также увеличении вязкости липидной фазы липопротеинов [8]. Изменения в относительной интенсивности полос поглощения при 2924 и 2854 см⁻¹ и полосы валентных колебаний карбонильной группы при 1736 см⁻¹ в ИК-спектрах пациентов с инфарктом мозга (см. рис. 1, кривая 2) и пациентов с ИБС (см. рис. 1, кривые 3 и 4) по сравнению с ИК-спектром контрольной группы (см. рис. 1, кривая 1) свидетельствуют об изменении структуры липопротеинов. Учитывая оба этих экспериментальных факта, можно сделать вывод, что наблюдаемое увеличение связывания зонда АНС в плазме крови у пациентов с инфарктом мозга и ИБС обусловлено изменением структуры липопротеинов при дислипидемии разного генеза, приводящим к появлению дополнительных положительно заряженных групп на поверхности ЛПНП и ЛПОНП.

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод, что при отсутствии изменений во вторичной и третичной структуре альбумина повышение связывания анионных гидрофобных метаболитов в плазме крови пациентов с дислипидемией и лакунарным инфарктом мозга и ИБС по сравнению с контролем обусловлено структурными изменениями в ЛПНП и ЛПОНП.

Библиографические ссылки

1. Shaw RA, Mantsch HH. Infrared spectroscopy in clinical and diagnostic analysis. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation. Volume 1*. Chichester: John Wiley and Sons; 2000. [p. 83–102].
2. Ivanov AI, Korolenko EA, Korolik EV, Firsov SP, Zhabankov RG, Marchewka MK, et al. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;408(1):69–77. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00533-7.
3. Krilov D, Balarin M, Kosović M, Gamulin O, Brnjac-Kraljević J. FT-IR spectroscopy of lipoproteins – a comparative study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;73(4):701–706. DOI: 10.1016/j.saa.2009.03.015.
4. Аронов ДМ. *Лечение и профилактика атеросклероза*. Москва: Триада-Х; 2000. 411 с.
5. Королик АК, Дикевич АЭ, Оганова ЕГ, Короленко ЕА, Королик ЕВ, Иванов АА. Структурно-функциональное состояние основных транспортных белков плазмы крови пациентов с дислипидемией. В: Кирковский ВВ, редактор. *Экстракорпоральная гемокоррекция в интенсивной терапии критических состояний. Тезисы докладов 6-й Международной научно-практической конференции; 23 мая 2013 г.; Минск, Беларусь*. Минск: Белорусский государственный медицинский университет; 2013. с. 89–92.
6. Короленко ЕА, Королик ЕВ, Королик АК, Кирковский ВВ. Оценка методом флуоресцентного зондирования связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови при циррозе печени. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2007;74(4):507–511.
7. Королик ЕВ, Короленко ЕА, Третинников ОН, Козлякова ОВ, Королик АК, Кирковский ВВ. Динамика уровня липопротеинов в плазме крови беременных женщин в зависимости от сроков беременности по данным ИК фурье-спектроскопии. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2012;79(6):933–937.
8. Формазюк ВЕ, Добрецов ГЕ, Владимиров ЮА. Измерение поверхностного заряда липопротеидов, выделенных из плазмы крови лиц с гиперальфалипотеидемией. *Вопросы медицинской химии*. 1981;27(1):125–128.

References

1. Shaw RA, Mantsch HH. Infrared spectroscopy in clinical and diagnostic analysis. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation. Volume 1*. Chichester: John Wiley and Sons; 2000. [p. 83–102].
2. Ivanov AI, Korolenko EA, Korolik EV, Firsov SP, Zhabankov RG, Marchewka MK, et al. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;408(1):69–77. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00533-7.
3. Krilov D, Balarin M, Kosović M, Gamulin O, Brnjac-Kraljević J. FT-IR spectroscopy of lipoproteins – a comparative study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;73(4):701–706. DOI: 10.1016/j.saa.2009.03.015.
4. Aronov DM. *Lechenie i profilaktika ateroskleroza* [Treatment and prevention of atherosclerosis]. Moscow: Triada-X; 2000. 411 p. Russian.

5. Korolik AK, Dikevich AE, Oganova EG, Korolenko EA, Korolik EV, Ivanov AA. [Structural and functional state of the main transport proteins of the blood plasma of patients with dyslipidemia]. In: Kirkovskii VV, editor. *Ekstrakorporal'naya gemokorreksiya v intensivnoi terapii kriticheskikh sostoyanii. Tezisy докладов 6-й Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 23 maya 2013 g.; Minsk, Belarus* [Extra-corporeal hemocorrection in intensive care of critical conditions. Collection of reports of the 6th International scientific and practical conference; 2013 May 23; Minsk, Belarus']. Minsk: Belarusian State Medical University; 2013. p. 89–92. Russian.
6. Korolenko EA, Korolik EV, Korolik AK, Kirkovskij VV. Estimation of the binding ability of main transport proteins of blood plasma at liver cirrhosis by the method of fluorescent probes. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2007;74(4):507–511. Russian.
7. Korolik EV, Korolenko EA, Tretinnikov ON, Kozlyakova OV, Korolik AK, Kirkovskiy VV. Dynamics of lipoproteins level in blood plasma of pregnant women against gestational age according to FTIR spectroscopy data. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2012;79(6):933–937. Russian.
8. Formazyuk VE, Dobretsov GE, Vladimirov YuA. [Change in the surface charge of lipoproteins isolated from the blood plasma of individuals with hyperalphalipoproteinemia]. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1981;27(1):125–128. Russian.

Статья поступила в редакцию 06.07.2020.
Received by editorial board 06.07.2020.