

кулярные водородные связи с рецептором, приблизительно одинаково, в то время как в молекуле (2) свободных гидроксильных групп ОН в три раза больше, чем ОН. Такие различия в соотношении свободных гидроксильных групп диольной системы боковой цепи в обеих молекулах, на наш взгляд, могут быть одной из важных причин их различной биологической активности.

СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОСЕКУНДНОЙ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ТРОМБИНА ИЗ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Борисевич Н.А.¹, Лозникова С.Ж.², Суходола А.А.¹

¹*Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск*

²*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск
e-mail: sukhodola@imaph.bas-net.by*

Введение. Ферментативный белок тромбин (α -тромбин) является важнейшим компонентом системы свёртывания крови человека [1]. Вместе с фибрином он активно участвует в процессах образования тромбов, являющихся одной из основных причин ишемического инсульта [2].

Функциональная активность тромбина тесно связана с его внутримолекулярной динамикой [3]. Выраженная зависимость времени жизни τ фосфоресценции остатков одной из ароматических кислот – триптофана от молекулярной подвижности окружения хромофора и соответствие времен жизни триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре (ТФКТ) характерным временам низкочастотных флуктуаций структуры макромолекул позволяют изучать фосфоресцентным методом медленную внутримолекулярную динамику тромбина в диапазоне $10^{-6} - 1$ с [4]. Корреляция между функциональной активностью белка и его микросекундной внутримолекулярной динамикой, оцениваемой на основе времени жизни ТФКТ, позволяет предсказывать изменения активности тромбина при изменении временных параметров ТФКТ [4].

В настоящей работе обнаружена микросекундная фосфоресценция тромбина при комнатной температуре и исследованы параметры этого свечения. Проведен анализ внутримолекулярной динамики тромбина в условиях моделирования ацидоза (снижение рН среды с 8.0 до 5.0), в

присутствии ацетилсалициловой кислоты и антиоксиданта эмоксипина в терапевтических концентрациях.

Методика эксперимента. Тромбин человека, ацетилсалициловая кислота, соли для приготовления буферных растворов, NaCl, MgSO₄ были получены из "Sigma-Aldrich" (США). Эмоксипин был получен из «Белбиофарм» (Беларусь). Для приготовления растворов тромбина использовали 0,155 моль/л Na-фосфатный буфер (спектры и кинетика затухания флуоресценции), 0,155 моль/л лимонно-фосфатный буфер (рН-зависимость).

Измерения кинетики и спектров флуоресценции в микросекундном диапазоне проводились на автоматизированном лазерном спектрометре, созданном в Институте физики им. Степанова НАН Беларуси [5]. В качестве возбуждающего излучения использовались импульсы четвертой гармоники ($\lambda_{\text{в.}} = 266$ нм) лазера на неодиме YAG: Nd³⁺ длительностью 10 нс. Исследуемый образец находился в кварцевой кювете размером 1×1 см. Люминесценция образца под прямым углом к возбуждающему излучению фокусировалась на входную щель монохроматора МДР-23. Прошедшее через монохроматор излучение регистрировалось фотоэлектронным умножителем, сигнал с которого подавался на один из каналов аналого-цифрового преобразователя (АЦП). На второй канал АЦП подавался опорный сигнал с фотодиода, который контролировал интенсивность возбуждающего излучения. Данные АЦП обрабатывались компьютером.

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что тромбин человека в водном растворе обладает способностью к флуоресценции при комнатной температуре (ФКТ) в микросекундном диапазоне. Мгновенные спектры этого свечения, измеренные через 30, 100 и 500 мкс после возбуждающего импульса, локализованы в области 400 – 600 нм, характерной для флуоресценции триптофана [4]. Кинетика затухания ТФКТ тромбина, измеренная для длины волны регистрации 450 нм, является биэкспоненциальной с временами жизни быстрого и медленного компонентов флуоресценции $\tau_1 = 74,9 \pm 0,59$ мкс, $\tau_2 = 432,4 \pm 2,9$ мкс. Биэкспоненциальность кривой затухания ТФКТ указывает на гетерогенность структурно-динамических свойств макромолекулы в областях локализации триптофанилов

Аминокислотная последовательность тромбина из крови человека включает девять триптофановых остатков. Флуоресцировать при комнатной температуре способны триптофаны, локализованные в участках макромолекулы с ограниченной ВМД (жесткой структурой). Хромофоры, расположенные в жестком гидрофобном ядре глобулы, обладают

большими значениями τ ТФКТ, чем хромофоры, находящиеся в периферических участках белковой глобулы [6].

Бизэкспоненциальность кинетических кривых затухания ТФКТ тромбина отражает существование в белке структур, дискретно различающихся по жесткости. Со временем жизни τ_2 (около 430 мкс) фосфоресцируют триптофаны, локализованные в тех местах, где ВМД белков заторможена. Обычно участки с такой жесткой структурой находятся в глубине гидрофобного ядра глобулы. Триптофаны, фосфоресцирующие со временем жизни τ_1 (около 75 мкс) включены в состав участков структур белков с умеренно лабильной ВМД.

Концентрация ионов водорода в среде является важным фактором, контролирующим функциональную активность белков. Поскольку тромбин участвует в формировании тромбов при инсульте [2], было изучено влияние рН среды на его ВМД. Значения времени жизни τ_1 и τ_2 быстрой и медленной компонент микросекундной ТФКТ при изменении рН среды в интервале 8.0 – 5.0 резко уменьшались. Можно предположить, что в условиях лактат-ацидоза снижение ВМД и функциональной активности тромбина играет защитную роль, предотвращая дальнейшее образование тромбов.

Нами исследовано действие ацетилсалициловой кислоты и эмоксипина на ВМД тромбина из крови человека. Установлено, что повышение содержания в среде ацетилсалициловой кислоты в интервале концентраций $10^{-2} - 10^{-4}$ мг/мл и эмоксипина в интервале концентраций $10^{-3} - 10^{-7}$ мг/мл не приводит к изменению значений времен жизни ТФКТ белка. Таким образом, ацетилсалициловая кислота и эмоксипин в терапевтических концентрациях, используемых для лечения последствий инсульта, не влияет на структурно-динамическое состояние тромбина из крови человека.

Заключение. Обнаружена способность тромбина человека к триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре в микросекундном диапазоне и изучены ее спектральные и кинетические параметры. Установлено, что снижение рН среды с 8.0 до 5.0 значительно влияет на внутримолекулярную динамику тромбина. Статистически значимых изменений ВМД тромбина под действием ацетилсалициловой кислоты и эмоксипина в терапевтических концентрациях, используемых для лечения последствий инсульта, не обнаружено. Полученные данные помогут уточнить механизмы развития инсульта и пути его лечения.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б11-059).

Литература

1. Siller-Matula J.M.a, Schwameis M.b, Blann A.c, Mannhalter C.d, Jilma B.b Thrombin as a multi-functional enzyme: Focus on in vitro and in vivo effects (Review) // Thrombosis and Haemostasis – 2011 – Vol. 106, N 6. – P. 1020-1033.
2. Undas A., Ariëns R.A.S. Fibrin clot structure and function: A role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases (Review) // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology –2011 – Vol. 31, N 12. – P. e88-e99
3. Bahar I., Lezon T.R.,Yang L.-W., Eyal E. Global dynamics of proteins: Bridging between structure and function (Review) // Annual Review of Biophysics – 2010 – Vol. 39, N 1. – P. 23-42.
4. Mazhul V.M.,Zaitseva E.M.,Shcharbin D.G. Intramolecular dynamics and functional activity of proteins // Biofizika – 2000 – Vol. 45, N 6. – P. 986-989.
5. Борисевич Н. А., Суходола А. А., Толсторожев Г. Б. Природа длительной люминесценции N-метилиндола и индола в газовой фазе // Журн. прикл. спектр. – 2007 – Vol. 74, № 3. – P. 341-345.
6. Gonnelli M.,Strambini G.B. Phosphorescence lifetime of tryptophan in proteins // Biochemistry – 1995 – Vol. 34, N 42. – P. 13847-13857.

СВОЙСТВА ВОДНО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ С БЕЛКАМИ ПО ДАННЫМ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Воробьев Е.А., Петренко Ю.М.

РНИМУ, Москва, РФ, yury_petrenko@mail.ru

Ранее на международной научной конференции в Минске, ставшей традиционной и уважаемой, мы докладывали о методе молекулярной динамики (МД) и его применении для анализа молекулярных систем и, в частности, о нашей МД разработке — Виртуальной молекулярно динамической установке (ВМУ) [1]. В последние годы интерес к такому подходу научных исследований существенно возрос. Появились ресурсы МД, программаторы, например, GROMACS [2], в среде которых можно создавать молекулярные системы и изучать их поведение. В данной работе с использованием среды GROMACS изучалось поведение более простых молекулярных систем, но важных в плане изучения такого