

Оригинальная статья

Влияние электромагнитного поля низкой частоты на триптофановую флуоресценцию человеческого сывороточного альбумина

Текуцкая Е.Е.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет»

Поступила в редакцию 28 октября 2019 г., Принята в печать 23 ноября 2019 г.

© 2019, Текуцкая Е.Е.

© 2019, Психосоматические и интегративные исследования

Резюме:

Исследованы механизмы денатурации молекул человеческого сывороточного альбумина (HSA) под действием электромагнитного поля низкой частоты при различных значениях pH растворов методами флуоресцентного анализа по изучению собственной белковой триптофановой флуоресценции. Показан конформационный функциональный N – F переход HSA, происходящий при уменьшении значения pH растворов от 6,5 до 3,5. Тушение триптофановой флуоресценции HSA указывает на одностадийный характер денатурации при pH > pI HSA – разрыхление белковых глобул. Вторая стадия, полное разворачивание аминокислотной цепи белка под действием ЭМП частотой от 3 до 32 Гц, не происходит.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, триптофановая флуоресценция, низкочастотное электромагнитное поле, денатурационные переходы.

Библиографическая ссылка: Текуцкая Е.Е. Влияние электромагнитного поля низкой частоты на триптофановую флуоресценцию человеческого сывороточного альбумина. Психосоматические и интегративные исследования 2019; 5: 0404.

Original article

Influence of the electromagnetic field of low frequency on triptofanovy fluorescence of the human serum albumine

Tekutskaya E.E.

The Kuban State University, Krasnodar, 350040, Russia

Received on 28 October 2019, Accepted on 23 November 2019

© 2019, Tekutskaya E.E.

© 2019, Psychosomatic and Integrative Research

Summary:

Mechanisms of a denaturation of molecules of human serum albumin (HSA) under the in-fluence of an electromagnetic field of low frequency at various pH values of solutions are investigated by methods of the fluorescent analysis on studying of own proteinaceous triptofanovy fluorescence. The conformational functional N-F transition of HAS happening at reduction of pH value of solutions from 6,5 to 3,5 is shown. Suppression of triptofanovy fluorescence of HAS indicates single-stage character of a denaturation at pH > pI HSA – a loosening proteinaceous molecules. The second stage, a full deployment of an amino-acid chain of protein under the in-fluence of EMP with a frequency from 3 to 32 Hz, does not occur.

Keywords: human serum albumin, triptofanovy fluorescence, low-frequency electromagnetic field, denaturation transitions.

Cite as Tekutskaya E.E. Influence of the electromagnetic field of low frequency on triptofanovy fluorescence of the human serum albumine. Psychosomatic and Integrative Research 2019; 5: 0404.

Введение. Сывороточный альбумин, помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, выполняют важную функцию, осуществляя транспорт эндогенных и экзогенных субстанций [1]. В основе транспортной функции

альбумина лежит способность к обратимому связыванию лигандов различной химической структуры, таких как биологически активные вещества [2], жирные кислоты [3], неорганические ионы [4], а также лекарственные вещества и их метаболиты [5, 6]. Известно, что связывание лекарственных соединений с плазменными белками играет важную роль в их распределении, а также влияет на фармакологическую активность и кинетику. Благодаря связыванию повышается растворимость лигандов в плазме крови, снижается их токсичность, осуществляется защита связанных соединений от ферментативной и окислительной деградации [7].

Ранее в серии работ нами была показана возможность изменения физико-химических свойств биополимеров различных типов при воздействии на них электромагнитным полем низкой частоты (ЭМП НЧ) [8 - 12].

Целью настоящей работы было исследование влияния низкочастотного электромагнитного поля в диапазоне частот от 3 до 50 Гц на конформационные изменения человеческого сывороточного альбумина и смеси природных белков плазмы крови методами адсорбционной и флуоресцентной спектроскопии.

Материалы и методы. В эксперименте использовались растворы триптофана, тирозина, человеческого сывороточного альбумина (HSA), плазмы крови. Водный раствор HSA был получен путем разведения сухой навески белка (Sigma-Aldrich) физиологическим раствором до концентрации 50 мкМ. Рабочие растворы HSA готовили с использованием бидистиллированной воды с концентрацией NaCl, равной 0,1 М и соответствующих добавок HCl или NaOH. При подготовке образцов не использовали буферные растворы, фиксирующие pH среды. Для стабилизации раствора образцы перед измерением хранились сутки при температуре 40С. Для исследования растворы смешивали таким образом, чтобы концентрации HSA в конечных растворах составляли $1 \cdot 10^{-6}$ М.

Спектры поглощения получали с использованием двухлучевого спектрофотометра U-2900 (Япония). Снятие спектров поглощения в ультрафиолетовой области спектра проводилось в кювете из кварца толщиной 10 мм. Обработку полученных данных осуществляли с помощью программы UV-Solutions.

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре Hitachi F-2700 (Япония). Триптофановая флуоресценция растворов HSA регистрировалась в диапазоне 270 – 500 nm при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295$ nm.

Обработка проб электромагнитным полем. Обработку растворов HSA ЭМП НЧ проводили в химически чистой стерильной пластиковой посуде при температуре 21–230С и толщине облученного слоя 2 мм в экранированной камере, которая обеспечивала ослабление внешних постоянных (в том числе и геомагнитного) и переменных полей не менее чем в 100 раз. Время обработки пробы ЭМП составляло 10 мин. Напряженность магнитной составляющей поля контролировалась измерителем напряженности электрических и магнитных полей ПЗ-80 и достигала 24 ± 3 А/м. Частота ЭМП изменялась с шагом 0,2 Гц в диапазоне от 0,5 до 50 Гц. В ходе экспериментов использовалось разработанное нами устройство для автоматизированного исследования биологических жидкостей в переменном магнитном поле [13]. Полученные данные анализировали в пакете статистического анализа Statistica 6.0 [14].

Результаты и их обсуждение. Альбумин относится к одному из наиболее изученных протеинов млекопитающих, молекулярная структура которого полностью расшифрована [1]. Сывороточный альбумин человека (HSA, human serum albumin) является одноцепочечным белком, состоящим из 585 аминокислотных остатков, имеет М.м. 66,5 кДа и изоэлектрическую точку pI 4,9. Кристаллографический анализ HSA и его рекомбинантных форм (rHSA) показал, что полипептидная цепь образует асимметричную глобулу в форме сердца с размерами приблизительно $80 \times 80 \times 30$ Å, на 67% спирализованную в α -спираль (рис. 1). С помощью рентгеноструктурного анализа выяснено, что белок состоит из трех похожих доменов (I–III), каждый из которых включает по два субдомена (А и В). Субдомен А образован шестью, а субдомен В — четырьмя α -спиралями, связанными в гибкие петли.

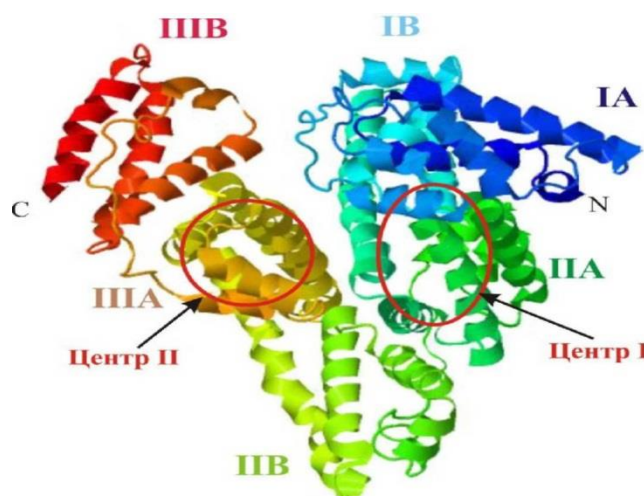


Рис. 1 Структура сывороточного альбумина человека (PDB код: 1bm0). Обозначено подразделение альбумина на домены и субдомены (А и В), а также примерная локализация центров I и II по Sudlow [15].

Несмотря на многообразие переносимых веществ, существует ограниченное число типов мест связывания на молекуле альбумина, в идентификации которых основополагающей считается работа G. Sudlow и соавт. [15], в которой авторы выделили 2 центра связывания лигандов на молекуле белка, которые впоследствии получили название центров (участков) I и II по Sudlow (рис. 1).

Маркерами центра I являются варфарин, иодипамид, азапропазон, билирубин и др.; маркерами центра II служат триптофан, диазепам и др. [16]. В кристаллической структуре HSA или gHSA участок I имеет вид кармана в субдомене IIA (рис. 1) и содержит единственный в молекуле альбумина человека остаток триптофана - Трп-214. Гидрофобные участки белковой цепочки обращены во внутреннюю полость кармана; вход в карман окружен положительно заряженными аминокислотными остатками [1]. Центр I является довольно обширным, поскольку связывает такие крупные молекулы, как билирубин. Тот факт, что лиганды различной химической структуры связываются центром I с высоким сродством, говорит о значительной гибкости данного участка [17].

Гибкость молекулы альбумина, чрезвычайная конформационная ла-бильность и способность молекулы к скручиванию и раскручиванию (fold-ing/unfolding), а также восприимчивость к различного рода регуляторным влияниям [18 - 19] создает предпосылки для реализации аллостерических влияний со стороны разнообразных соединений на связывание лигандов с белком [20].

Выбор оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции растворов HSA.

Флуоресценция белков обычно возбуждается в максимуме их поглощения. Для выбора оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции HSA регистрировались спектры поглощения водных растворов тирозина, триптофана и альбумина, приведенные на рис.2.

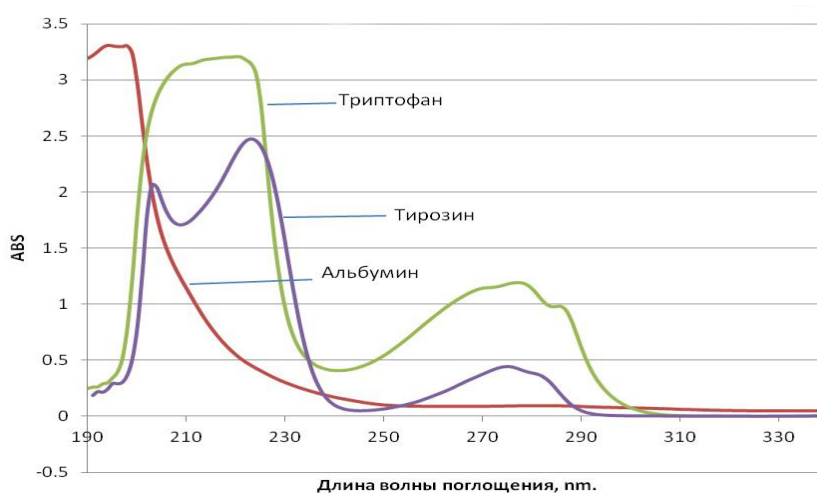


Рис. 2 Спектры поглощения водных растворов HSA ($C = 0,04 \text{ мг/мл}$), триптофана ($C = 0,05 \text{ мг/мл}$), тирозина ($C = 0,05 \text{ мг/мл}$), pH 7,5, $t = 200\text{C}$

Обе ароматические аминокислоты и тирозин, и триптофан обладают заметным поглощением в ультрафиолетовой области (рис.2). Для уточнения значения $\lambda_{\text{возб}}$ были получены спектры собственной флуоресценции растворов триптофана и тирозина при изменении длины волны возбуждения от 275 до 295 нм, представленные на рис.3.

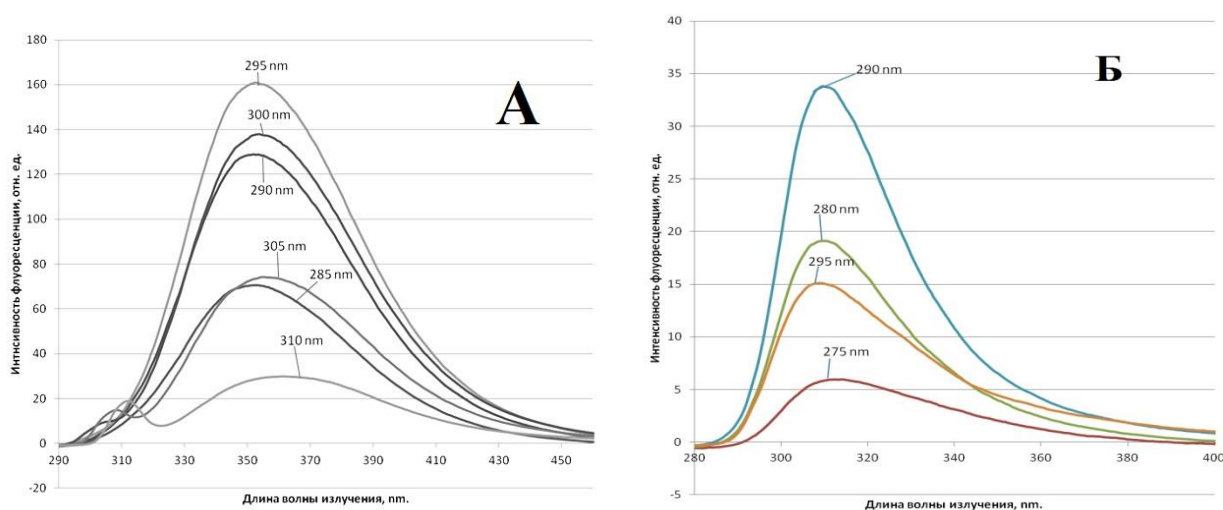


Рис. 3 Спектры флуоресценции растворов триптофана – А и тирозина – Б при изменении длины волны возбуждения от 275 до 295 нм, $t = 20\text{ oC}$, pH 5,5

Выяснено, что испускание тирозина в воде происходит при длине волны возбуждения 310 ± 2 нм и сравнительно нечувствительно к полярности растворителя. Максимум испускания триптофана в воде находится при $\lambda_{\text{фл макс}} = 355 \pm 3$ нм и сильно зависит от полярности, причем максимальная величина интенсивности флуоресценции $I_{\text{фл макс}}$ для триптофана значительно выше, чем для тирозина. При длинах волн возбуждения более 295 нм поглощает главным образом триптофан. Кроме того, авторами работ [17, 21] отмечается, что флуоресцентные свойства аминокислотного остатка триптофана в молекуле HSA весьма чувствительны к перестройкам макромолекулы белка, поэтому при изучении влияния внешних воздействий на молекулу HSA в целом и на центр связывания I, в частности, удобно использовать именно триптофановую флуоресценцию HSA.

Триптофановая флуоресценция в исследованиях конформационных переходов HSA при изменении pH раствора в диапазоне 3,0–6,5.

Модификации во внутримолекулярной динамике белков в растворах, происходящие при изменении pH растворов в отсутствие воздействия ЭМП в исследуемом диапазоне (3,0–6,5), относятся к функциональным переходам, так как они происходят в пределах нативной структуры белка [1]. Проведены исследования флуоресцентно – спектральных характеристик аминокислотного остатка триптофана в молекуле HSA при различных значениях pH растворов. Получены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции $I_{\text{фл макс}}$ и длины волны в максимуме спектра флуоресценции $\lambda_{\text{фл макс}}$ HSA от pH раствора, приведенные на рис. 4. Спектр испускания HSA претерпевает коротковолновый сдвиг по сравнению с испусканием триптофана в воде. Этот коротковолновый сдвиг связан с экранированием триптофановых остатков от водной фазы гидрофобным окружением.

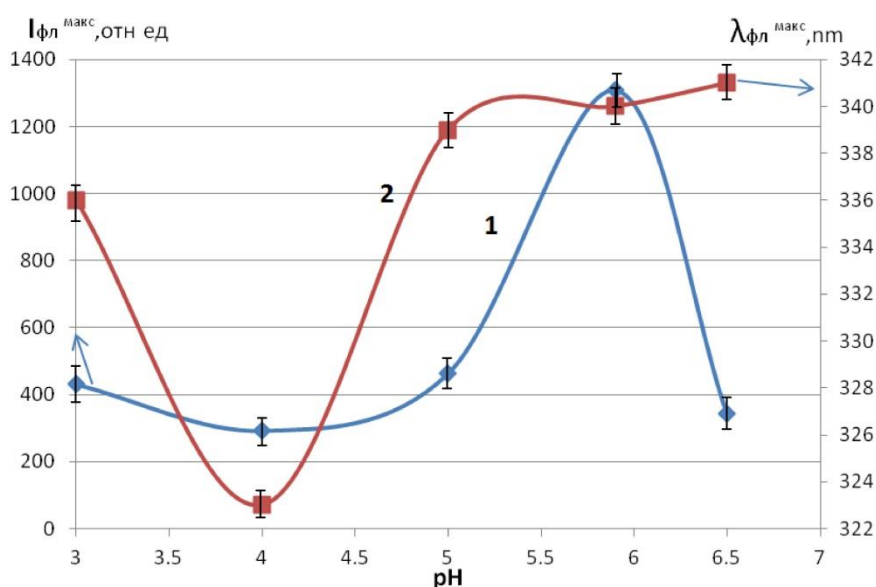


Рис. 4 Зависимости интенсивности $I_{\text{фл макс}}$ (1) и длины волны $\lambda_{\text{фл макс}}$ (2) в максимуме спектра флуоресценции HSA ($1 \cdot 10^{-6}$ М) от pH растворов в отсутствие воздействия ЭМП НЧ ($\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм)

Как видно из рис. 4 – кривая 1, при увеличении значения pH от 4,0 до 6,0 происходит увеличение интенсивности флуоресценции $I_{\text{фл макс}}$. Помимо разгорания триптофановой флуоресценции HSA, при увеличении pH происходит красный сдвиг спектра флуоресценции, что обусловлено конформационным функциональным переходом HSA (так называемым N - F переходом) и протонированием карбоксильных групп белка (рис. 4 – кривая 2). F-форма HSA, имеющая место при низких значениях pH, характеризуется более рыхлой структурой с разупорядоченными гидрофобными областями. Максимумы испускания триптофана очень чувствительны к полярности растворителя, равно как и к специфическим взаимодействиям между растворителем и индольным кольцом. Поэтому можно ожидать, что максимумы испускания белков должны зависеть от тех факторов, которые влияют на экспонирование триптофановых остатков в водную фазу. Предполагается, что N – F переход сопровождается раскрытием гидрофильных поверхностей белковой молекулы, а затем при функциональном переходе $F^- \rightarrow F$ открываются гидрофобные зоны белка [18] и таким образом происходит тушение флуоресценции при уменьшении pH раствора.

При $\text{pH} > 6,0$ альбумин также подвержен pH-зависимым конформационным изменениям, которые в литературе получили название нейтрально-основного или N—B перехода [19]. Эти переходы сопровождаются изменением микроокружения аминокислотных остатков триптофана, тирозина, гистидина, в результате повышается доступность имидазольных остатков, скрытых в N-форме и происходит уменьшение интенсивности флуоресценции $I_{\text{фл макс}}$, как это видно из рис.4.

Триптофановая флуоресценция в исследованиях денатурационных переходов HSA под действием ЭМП НЧ при различных значениях pH.

Нами изучалось действие ЭМП НЧ на растворы HSA, имеющие различные значения pH. На рис.5 приведены спектры триптофановой флуоресценции при различных значениях pH растворов HSA после обработки ЭМП частотами от 3 до 32 Гц. Величина интенсивности триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина при обработке электромагнитным полем изменялась от 230 до 500 отн. ед. в зависимости от используемой частоты ЭМП.

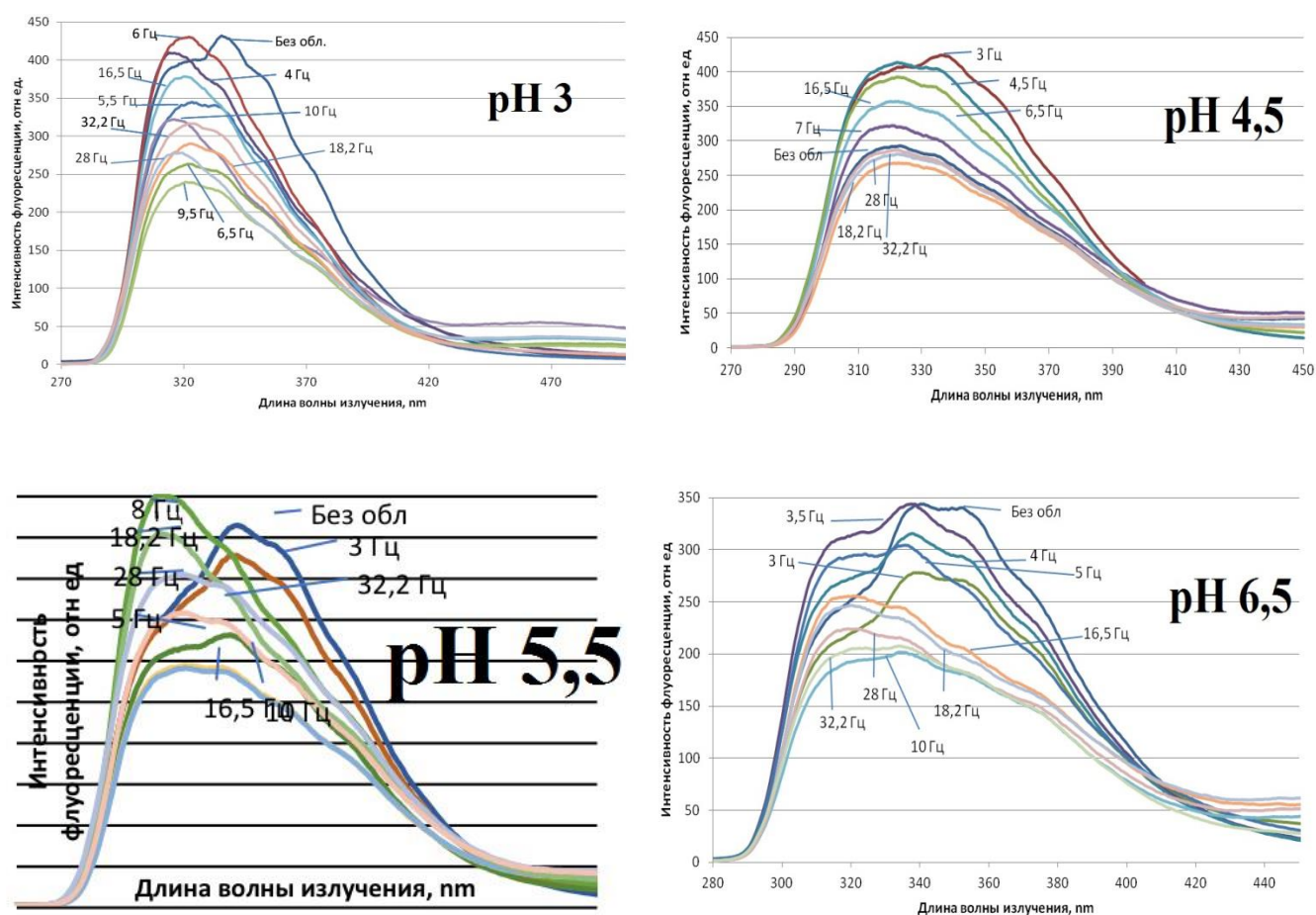


Рис. 5 Спектры триптофановой флуоресценции HSA при обработке ЭМП разной частоты при разных pH раствора. Время облучения образцов 10 мин., $t = 23$ оС, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ nm

Как видно из рис. 5, при pH 3 интенсивность флуоресценции $I_{\text{фл макс}}$ при обработке раствора HSA электромагнитным полем уменьшается с 440 (без обработки ЭМП) до 230 отн. ед., при этом максимум флуоресценции $\lambda_{\text{фл макс}}$ смещается в коротковолновую область на 15-20 нм. Это свидетельствует об изменениях, происходящих в центре связывания 1 молекулы альбумина, при действии ЭМП, а именно об увеличении (разрыхлении) F-формы HSA и открытии гидрофобной зоны, что приводит к проникновению молекул воды в данный центр, дальнейшему их взаимодействию с ароматическим кольцом триптофана и тушению его флуоресценции.

При pH раствора 4,5, близком к изоэлектрической точке альбумина, воздействие ЭМП частотами от 3 до 32 Гц приводит к разгоранию триптофановой флуоресценции HSA, что свидетельствует об уменьшении доступности аминокислотных остатков альбумина в центре 1 для молекул воды и об уплотнении их гидрофобного окружения при данном pH.

Обработка ЭМП водных растворов HSA с pH, большим 4,5 приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции для всех изученных частот. Наблюдаемое тушение триптофановой флуоресценции HSA при данном режиме обработки указывает на одностадийный характер денатурации альбумина при $\text{pH} > \text{pI}$ HSA – разрыхление белковых глобул. Вторая стадия, полное разворачивание аминокислотной цепи белка под действием ЭМП частотой от 3 до 32 Гц, не происходит.

Было обнаружено, что зависимости интенсивности флуоресценции плазмы крови здорового человека и растворов HSA, имеющих одинаковые значения pH, при $\lambda_{\text{возб.}} = 295$ nm от частоты электромагнитного поля коррелируют друг с другом. Так, при обработке ЭМП частотами 6,5 и 8,5 Гц – наблюдается тушение флуоресценции как раствора HSA, так и плазмы крови, а частотами 4,5 – 6 Гц и 7,5 Гц – ее увеличение. При действии ЭМП НЧ на плазму крови здорового человека отмечается значительное увеличение интенсивности флуоресценции от 190 до 1500 отн. ед. в интервале длин волн от 320 до 380 nm. Данный факт свидетельствует о том, что основной вклад во флуоресценцию плазмы крови, по-видимому, вносит белок альбумин, процентное содержание которого в плазме составляет 60 %. Столь значительное увеличение флуоресценции (от 190 до 1500 отн.ед.) может говорить об изменении конформации альбумина, находящегося в плазме крови, под действием ЭМП НЧ.

Полученные эффекты согласуются с выводами авторов работы [22], в которой показано, что обработка магнитным полем водных растворов альбуминов приводит к существенным изменениям белковых макромолекул и обусловлены, хотя бы частично, изменением свойств водной фазы. О возможностях оценки параметров изменения гидратной оболочки белков при различных внешних воздействиях указывают и авторы работ [23 - 24].

Заключение

На основании вышеприведенных данных, можно предположить, что с помощью низкоинтенсивного ЭМП НЧ возможно изменять состояние макромолекул сывороточного альбумина человека в плазме крови и тем самым изменять ее способность связывать и транспортировать лиганды различной химической природы, в том числе и лекарственные препараты.

Список литературы

1. Peters T., Jr. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. - San Diego: Academic Press. 1996. 432 p.
2. Ascenzi P., Fasano M. Serum heme-albumin: an allosteric protein. IUBMB Life. 2009, V.61. №12. P.1118–1122
3. Van der Vusse G.J. Albumin as fatty acid transporter. Drug Metab. Pharmacokinet. 2009, V.24. №4. P.300–307
4. Lu J., Stewart A.J., Sadler P.J. et al. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. Biochem. Soc. Trans. 2008, V.36. №6. P.1317–1321
5. Kandagal P.B., Ashoka S., Seetharamappa J. et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. J. Pharm. Biomed. Anal. 2006, V.41. №2. P.393–399.
6. Varshney A., Sen P., Ahmad E. et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? Chirality. 2010, V.22. №1. P.77–87
7. Curry H.S., Whelpton R.D. Disposition and Pharmacokinetics from principles to application London: Wiley-Blackwell, UK. 2011. 235 p.
8. Текуцкая Е.Е., Васильев Ю.А., Храмова А.А. Исследование воздействия электромагнитного излучения низкой частоты на активность лимфоцитов. Российский иммунологический журнал, 2014, Т.8(17), №3, С. 466–469
9. Текуцкая Е.Е., Чебоchinov К.В., Прокофьев А.С. Действие электромагнитного поля низкой частоты на белки плазмы крови. International Research Journal №2 (44) Часть 3, 2016 С. 38-40. <https://e.mail.ru/message/1455551873000000704/>
10. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ильченко Г.П. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию водных растворов ДНК. Биофизика, 2015, Т. 60, вып.6, С. 1099-1103. DOI 10.1134/S000635091506024X
11. Текуцкая Е.Е., Василяди Р.В. Скрининг одноклеточных разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови человека при действии внешних факторов // Экология Человека, 2017, №.12. С. 9-14
12. Tekutskaya E.E., Barishev M. G. Study of influence of the low-frequency electromagnetic field on DNA molecules in water solutions. В сборнике: Odessa astronomical publications XIII Odessa astronomical GAMOW'S conf. Editor-in-Chief S.M. Andrievsky, 2013. С. 303-306
13. Ильченко Г.П., Барышев М.Г., Текуцкая Е.Е., Шелистов В. С., Никитин А.В. Устройство для поиска оптимальных параметров обработки биологических объектов переменным магнитным полем. Измерительная техника, 2017, №.6. С. 69-72
14. Gerasimov A. N. Medical statistics. Medical News Agency. 2007, 480 p.
15. Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. Spectroscopic techniques in the study of protein binding: A fluorescence technique for the evaluation of the albumin binding and displacement of warfarin and warfarin-alcohol. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1975, V.2. №2. P.129–140.
16. Watanabe H., Kragh-Hansen U., Tanase S. et al. Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. Biochem. J. 2001, V.357. №1. P.269-274.
17. Fanali G., Pariani G., Ascenzi P., Fasano M. Allosteric and binding properties of Asp1-Glu382 truncated recombinant human serum albumin--an optical and NMR spectroscopic investigation. FEBS J. 2009, V.276. №8. P.2241–2250
18. Kamal J.K.A., Zhao L., Zewail A.H. Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: Human serum albumin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004, V.101. №37. P.13411–13416
19. Noskov V.A., Mikhailovskaya A.A., Lin S.Y. et al. Bovine serum albumin unfolding at the air/water interface as studied by dilatational surface rheology. Langmuir. 2010, V.26. №22. P.17225–17231
20. Бендер К.И., Луцевич А.Н., Купчиков В.В. Роль конформационных изменений сывороточного альбумина и взаимодействие с ним лекарственных веществ. Фармакол. токсикол. 1989, Т.52. №5. С.85–95.
21. Bhattacharya M., Jain N., Bhasne K. et al. pH-induced conformational isomerization of bovine serum albumin studied by extrinsic and intrinsic protein fluorescence. J. Fluoresc. 2010; DOI 10.1007/s10895-010-0781-3.
22. Цейслер Ю.В., Мартынюк В.С., Артеменко А.Ю., Мирошниченко Н.С. Влияние магнитного поля разных частот на собственную флуоресценцию сывороточного альбумина. Физика живого. 2009, Т. 17, № 1. С. 94 - 97
23. Рубцова Е. В., Соловей А. Б., Лобышев В. И. Статистические характеристики гидратных оболочек белков. Компьютерное моделирование. Вестник МГУ. Серия 3 Физика и астрономия. 2015, Т.5, С.33–38
24. Текуцкая Е.Е., Турьян И.Я., Кравцов В.И., Кондратьев В.В. Константы протонирования фосфат-ионов в присутствии нитратов однозарядных катионов. Журнал неорганической химии. 1997, Т.42. №4, С.600-605

Авторы:

Текуцкая Елена Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры радиофизики и нанотехнологий ФГБОУ ВПО Кубанский государственный университет. Служебный адрес: Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149. Служебный телефон: (861) 219-95-01 доб.262, e-mail: tekytska@mail.ru