



Биолог. журн. Армении, 4 (65), 2013

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФИБРИНОГЕНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ

А.А. АРУТЮНЯН, Л.Г. ХАЧАТРЯН, Г.Г. АРЦРУНИ

*Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци
Научно-исследовательский центр, Лаборатория
биохимических и биофизических исследований
hayk@web.am*

Внешние электростатические поля (ЭСП) приводят к активации прооксидантных процессов, что среди прочего может привести к окислительной модификации белков. Фибриноген, вероятно, является наиболее чувствительным к окислительной атаке среди белков плазмы, что делает процесс свертывания крови в значительной степени зависимым от функционирования про-/антиоксидантного гомеостаза. В данной работе исследовалось влияние внешнего ЭСП напряженностью в 200 кВ/м на окислительную модификацию фибриногена и процесс свертывания крови крыс. Показано значительное повышение степени карбонилирования и окисления тирозина фибриногена у крыс, подвергнутых воздействию внешним ЭСП. Анализ полученных данных также позволяет сделать предположение о конформационных сдвигах в молекуле фибриногена под влиянием ЭСП. Было так же показано сокращение тромбинового времени свертывания плазмы крови животных, подвергнутых воздействию ЭСП.

*Электростатическое поле – фибриноген – свертывание крови –
окислительная модификация белков*

Արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտերը (ԷՄԴ) բերում են պրոօքսիդանտային պրոցեսների ակտիվացմանը, ինչն, այլոց թվում, կարող է բերել սպիտակուցների օքսիդատիվ փոփոխությունների: Ֆիբրինոգենը, հավանաբար, պլազմային սպիտակուցներից առավել զգայուն է օքսիդիչների նկատմամբ, ինչն արյան մակարդման գործընթացը դարձնում է խիստ կախված պրո-/հակաօքսիդանտային հոմեոստազից: Ներկա աշխատանքում ուսումնասիրվել է 200 կՎ/մ լարվածությամբ արտաքին ԷՄԴ ազդեցությունը ֆիբրինոգենի օքսիդատիվ մոդիֆիկացման և արյան մակարդման գործընթացի վրա: Ցույց է տրվել ֆիբրինոգենի կարբոնիլացում և թիրոզինի օքսիդացում արտաքին ԷՄԴ ազդեցությանը ենթարկված առնետների մոտ: Ստացված տվյալների վերլուծությունը թույլ է տվել ենթադրություն անել ԷՄԴ ազդեցության ներքո ֆիբրինոգենի կոնֆորմացիոն փոփոխությունների մասին: Ցույց է տրվել նաև, որ ԷՄԴ բերում է թրոմբինային ժամանակի կրճատմանը:

*Էլեկտրաստատիկ դաշտ – ֆիբրինոգեն – արյան մակարդում –
սպիտակուցների օքսիդատիվ մոդիֆիկացիա*

External electrostatic fields (ESF) lead to the activation of pro-oxidant processes which amongst others may cause an oxidative modification of proteins. Fibrinogen probably is the most sensitive to oxidative attack amongst plasma proteins, which make the blood clotting process highly dependent on the pro-/antioxidant homeostasis functioning. In the present paper, the effect of external ESF (200 kV/m tension) on the oxidative modification of fibrinogen and blood clotting process of rats was studied. Fibrinogen carbonylation and tyrosine oxidation increase at ESF-exposed animals was shown. Analysis

of the obtained data lead to an assumption of ESF dependent alterations in fibrinogen conformation. It was also shown plasma clotting thrombin time acceleration at the ESF exposed animals.

Electrostatic field – fibrinogen – blood clotting – oxidative modification of proteins

Окислительная модификация белков, вызванная избыточным образованием и/или недостаточной нейтрализацией реактивных форм кислорода, может привести к развитию тех или иных патологий [6]. Причины нарушений самих механизмов, регулирующих баланс окислительных и восстановительных процессов, различны. Среди них свое место занимает повышенный фон внешних электрических полей, обусловленный массовым использованием электроприборов и линий электропередач в быту и на производстве [2].

Каким образом внешние электрические поля могут привести к дисбалансу окислительных и восстановительных процессов и как это может отразиться на окислительной модификации белков - вопрос сложный и на сегодняшний день не полностью изученный. В ряде работ показана интенсификация газообмена, приводящая к увеличению снабжения тканей кислородом и стимулированию проокислительных процессов в результате влияния внешних электростатических полей [1]. Превалирование окислительных процессов может привести к повреждению различных биологических структур.

Под влиянием активных форм кислорода молекула белка может быть модифицирована тем или иным способом: окисление тиоловых групп; карбонилирование остатков пролина, аргинина, лизина и треонина; образование битирозина и метионин сульфоксида; разрыв кольца триптофана и др. [4, 9, 12].

Особый интерес представляет анализ окислительной модификации белков плазмы крови как системы, наиболее полно отражающей те или иные нарушения в организме. Данные литературы и наши собственные исследования свидетельствуют о том, что внешние электростатические поля приводят к незначительным сдвигам в карбонилировании суммарных белков плазмы крови. С другой стороны, нами ранее было показано повышение содержания битирозина и понижение флюоресценции триптофана в плазме крови крыс после экспозиции ЭСП [4]. Отсутствие эффекта на суммарных белках плазмы никак не может исключать возможности индукции полем окислительной модификации отдельных белков, что в литературе освещено недостаточно. Тем более, учитывая проокислительную составляющую действия внешних электрических полей и высокую чувствительность некоторых белков плазмы к окислению. В частности, данные литературы представляют фибриноген как наиболее чувствительный к окислительному стрессу среди плазменных белков [20]. Данные относительно последствий окисления фибриногена противоречивы. В большинстве случаев авторы наблюдали задержку перехода окисленного фибриногена в фибрин [16]. Тем не менее имеются публикации, приводящие противоположные результаты [19].

Настоящая работа посвящена изучению влияния внешнего электростатического поля на некоторые параметры окислительной модификации фибриногена и процесс свертывания крови крыс.

Материал и методика. Исследования проводились на белых лабораторных крысах – самцах, массой 180-200 г. За неделю до воздействия электростатическим полем производился забор образца крови с целью определения исследуемых показателей интактных животных (контрольная группа). По истечении 7 сут те же животные (5) подвергались воздействию электростатическим полем (опытная группа). Опыты были проведены в четырех повторах (n = 20).

С целью создания электростатического поля (ЭСП) применялась установка конденсаторного типа, разработанная на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Ереванского государственного медицинского института [3]. Индуцировался заряд с потенциалом 60 кВ при расстоянии между электродами 30 см, что генерировало ЭСП напряженностью 200 кВ/м. Животные подвергались воздействию ЭСП в течение часа.

Образцы крови (1,5-2,0 мл) были получены пункцией сердца за неделю и сразу после часового воздействия ЭСП. В качестве антикоагулянта применялся 3,8%-ный раствор цитрата Na, добавляемый к крови в соотношении 1:10. Фибриноген выделяли из плазмы крови осаж-

дением раствором Na_2SO_4 , добавляемым к плазме до конечной концентрации в 10,6 % и последующей отмывкой полученного осадка тем же раствором [10]. Концентрация фибриногена определялась по биуретовой реакции [23]. Карбонилирование фибриногена оценивалось по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с последующей фотометрией продукта (λ - 360 нм) [13].

Флюоресценция битирозина регистрировалась при длине возбуждения 325 нм и длине испускания 415 нм [32]. Флюоресценция триптофана измерялась соответственно при 296 и 340 нм [21]. Часть проб перед регистрацией флюоресценции инкубировалась в системе Фентона (FeSO_4 - $0,325 \times 10^{-5} \text{M}$, ЭДТА - $0,425 \times 10^{-5} \text{M}$ и H_2O_2 - $0,3 \times 10^{-4} \text{M}$) с целью определения модификации тирозина и триптофана при индуцированном окислении [7].

Тромбиновое время свертывания плазмы крови определяли с помощью раствора бычьего тромбина (конечная концентрация 8 МЕ/мл) [26].

Данные обрабатывались компьютерной программой GrafPad InStat. Результаты представлены в виде средней арифметической (М) и стандартной ошибки средней арифметической (m). Уровни достоверности обозначены: * при $p < 0.05$; ** при $p < 0.01$; *** при $p < 0.001$.

Результаты и обсуждение. Влияние электростатического поля (*in vivo*).

Как свидетельствуют полученные данные, внешнее ЭСП приводит к окислительной модификации фибриногена (рис. 1). В частности, наблюдалось повышение степени карбонилирования на 85,2% (рис. 1,А), а также увеличение на 35,14% содержания битирозина (рис. 1, Б). Разница в интенсивности флюоресценции, характерной для триптофана, незначительна, хотя и прослеживается тенденция к ее возрастанию. После часовой экспозиции ЭСП флюоресценция триптофана повысилась лишь на 5,3%. (рис. 1, В).

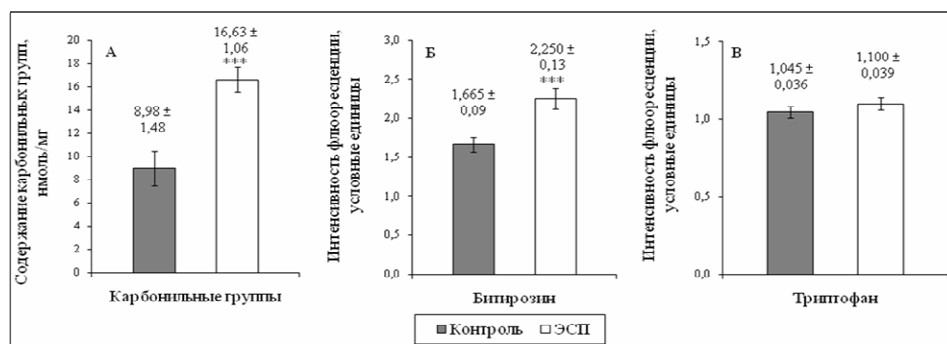


Рис. 1. Параметры окислительной модификации фибриногена

С целью выявления функциональной активности модифицированного электростатическим полем фибриногена было определено тромбиновое время свертывания как тест, наиболее полно отражающий вклад фибриногена в каскаде свертывания. Результаты анализа показали, что ЭСП приводит к значительному сокращению времени образования сгустка фибрина – на 39,2 % (рис. 2).

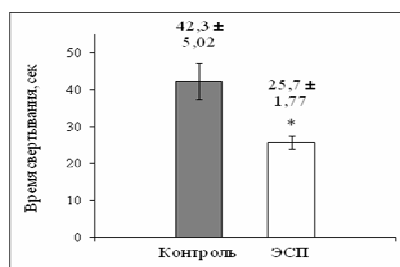


Рис. 2. Тромбиновое время свертывания плазмы крови крыс

Влияние активных форм кислорода (in vitro). С целью контроля проокислительной активности ЭСП нами была исследована окислительная модификация фибриногена в системе, генерирующей активные формы кислорода *in vitro*. Таким образом, было изучено влияние гидроксид ($\text{OH}\cdot$) и пероксид ($\text{OONH}\cdot$) радикалов, образующихся в процессе реакции Фентон на содержание битирозина и триптофана фибриногена. Результаты данного исследования наглядно демонстрируют четкий и противоположно направленный эффект на флюоресценцию указанных аминокислот (рис.3, табл.1). Показано двухкратное увеличение эмиссии битирозина и уменьшение таковой триптофана после 24-часовой инкубации фибриногена в системе Фентон.

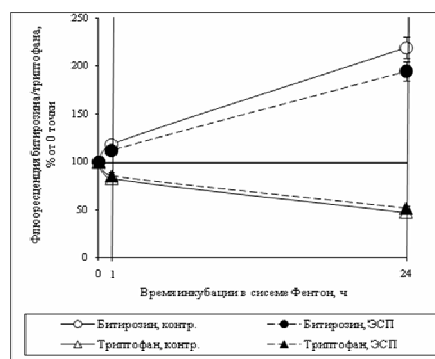


Рис. 3. Параметры флюоресценции, характерной для битирозина и триптофана, после инкубации фибриногена в системе Фентон. Приведены сравнительные данные по отношению к 0 точке

Таблица 1. Параметры флюоресценции, характерной для битирозина и триптофана, после инкубации фибриногена в системе Фентон (% от 0 точки)

Время инкубации в системе Фентон, ч	Битирозин		Триптофан	
	Контроль	ЭСП	Контроль	ЭСП
0	100 ± 5,8	100 ± 5,1	100 ± 3,2	100 ± 3,7
1	118 ± 6,4*	112 ± 6,3	83 ± 3,7**	85 ± 2,3**
24	219 ± 4,7***	194 ± 4,3***	47 ± 3,1***	51 ± 3,2***

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n = 10

Следует также отметить, что фибриноген, выделенный от животных, после часовой экспозиции электростатическим полем более резистентен к воздействию активных форм кислорода. Это наблюдение в особенности касается содержания битиро-

зина, в то время как эмиссия триптофана практически одинакова как в образцах фибриногена интактных, так и фибриногена, полученного после влияния поля.

Увеличение степени карбонилирования и содержания битирозина фибриногена наглядно демонстрирует активацию проокислительных процессов под влиянием ЭСП. Тем не менее, сопоставление результатов влияния поля с влиянием классической радикалгенерирующей системы, каковой является система Фентон, приводит на первый взгляд к различным результатам (рис. 4).

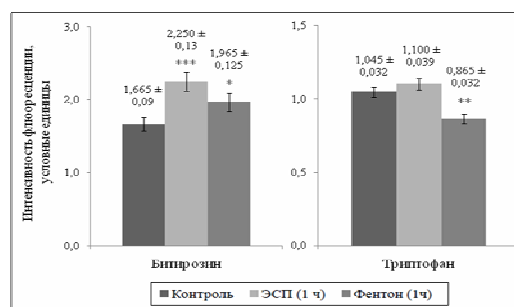


Рис. 4. Сравнительные данные влияния электростатического поля и реагента Фентон на окисление тирозина и триптофана

В частности, имеется в виду тенденция к увеличению флюоресценции триптофана под влиянием электростатического поля и, наоборот, понижение эмиссии триптофана под влиянием активных форм кислорода, генерируемых в системе Фентон. Окисленные производные триптофана (гидрокситриптофан, N-формилкинуренин, кинуренин, 3-гидроксикинуренин) имеют характерные параметры флюоресценции, т.е. иные максимумы эмиссии и отличные длины волн возбуждения от таковых, примененных нами с целью измерения флюоресценции, характерной для триптофана. Данный факт означает, что независимо от формы окисленного производного триптофана, эмиссия таковой при максимуме, характерном для триптофана, будет заниженной. Это было наглядно продемонстрировано в эксперименте *in vitro*, после инкубирования фибриногена в окислительной системе Фентон. Тем не менее, следует также учитывать факт понижения флюоресценции в результате денатурации белка, которая возможна как следствие его окислительной модификации [18]. Приведенные данные вводят некоторые кажущиеся затруднения в объяснении наблюдаемой *in vivo* тенденции к увеличению флюоресценции триптофана после воздействия ЭСП.

Имея в виду хорошо известный факт зависимости степени флюоресценции триптофана от его локализации в белковой молекуле [23], считаем возможным объяснение наблюдаемой тенденции конформационными изменениями фибриногена под влиянием поля. Так, установлено, что поверхностно локализованные и находящиеся в полярном окружении остатки триптофана в белке имеют сравнительно низкую интенсивность флюоресценции и смещенный вправо пик спектра ($\lambda_{\max}$ 350 nm). В то время как гидрофобное окружение глубоко локализованных в белке остатков триптофана приводит к смещению спектра в более низковолновую область ($\lambda_{\max}$ 330 nm) и повышению интенсивности флюоресценции [5, 18, 23]. На основании сказанного можно предположить, что ЭСП приводит к конформационным изменениям фибриногена, сопровождающимся интернализацией поверхностно расположенных остатков триптофана. Возможность инициирования конформационных изменений белков электрическими полями, как частотными, так и статическими описана в литературе на экспериментах *in vitro* [14, 22].

Кроме того, наблюдаемая тенденция увеличения флюоресценции триптофана может указывать на повышенный квантовый выход. Так, показано, что квантовый выход триптофана повышается с увеличением отрицательного заряда (повышение рН) его окружения в белке [15]. Таким образом, появляется возможность влияния окислительно модифицированных производных (например, карбонильных групп) на квантовый выход и интенсивность флюоресценции триптофана.

Различия в содержании битирозина после инкубации с реактивом Фентона фибриногена, выделенного до и после экспозиции электростатического поля (рис. 3), по всей вероятности, объясняются тем фактом, что у опытных животных часть тирозина уже была окислена под влиянием исследуемого фактора.

В пользу данного предположения говорят хорошо согласующиеся результаты: после воздействия поля получен 35,1%-ный прирост содержания битирозина, последующая инкубация с реактивом Фентона дает дополнительный 94 %-ный прирост. В то время как инкубация фибриногена, выделенного у интактных животных в окислительных условиях, приводит к 119%-ному повышению содержания битирозина, что чуть ниже суммы воздействий поля и продуктов окисления системы Фентона. Таким образом можно заключить, что часовая экспозиция ЭСП напряженностью 200 кВ/м по степени генерации активных форм кислорода эквивалентна 4-5 – часовой экспозиции в системе Фентона.

Активация образования сгустка фибрина, наблюдаемая после воздействия электростатического поля, с одной стороны, может быть объяснена конформационными изменениями молекулы фибриногена, возможно, приводящими к более высокому сродству с ферментом – протеазой тромбином. Данные литературы свидетельствуют о том, что окисленные белки более подвержены протеолизу, чем нативные. С другой стороны, начальная форма окисленного тирозина - тирозил-радикал может привести к его Тир-Тир сшивкам между различными белковыми молекулами, т.е. способствовать агрегации, что в свою очередь может способствовать "слипанию" фибрин-мономеров и таким образом привести к ускорению свертывания.

Установлено значительное повышение степени карбонилирования, содержания битирозина и тенденция к повышению флюоресценции триптофана в молекуле фибриногена под влиянием внешнего электростатического поля. Анализ данных позволяет сделать предположение, что механизм действия данного фактора включает не только окислительно-восстановительный дисбаланс, но и имеет иной путь воздействия, приводящий к конформационным изменениям белковой молекулы. Не исключено участие эффекта поляризации ионологических структур, приводящего к наблюдаемым последствиям. Наблюдаемая окислительная модификация фибриногена, а также предполагаемая конформационная перестройка приводят к ускорению образования сгустка фибрина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арируни Г.Г.* К вопросу о действии электростатического поля на процессы биологического окисления. Вопросы биологии. 1984, 3, с. 19-25;
2. *Арируни Г.Г., Соцкий О.П., Саакян М.А.* Влияние электростатического поля на АТФ-азную активность митохондрий печени и мембран эритроцитов. Биолог. журн. Армении, 55, 4, 263-266, ISSN 0366-5119, 2003.
3. *Арируни Г.Г.* Камера для изучения действия электростатических полей на мелких лабораторных животных. Удост. на рац. предложение. N134, 1983.
4. *Хачатрян, Л.Г., Арируни, Г.Г.* Окислительная модификация белков крови крыс по триптофану и тирозину после воздействия внешнего электростатического поля. Биолог. журн. Армении, 63, 3, с. 38-41, 2011.

5. Bell B., Stevens W.K., Jia Z., Samis J., Cote H.C.F., MacGillivray R.T.A., and Nesheim M.E. Fluorescence properties and functional roles of tryptophan residues 60d, 96, 148, 207, and 215 of thrombin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 38, 29513-29520, 2000.
6. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38, 2003.
7. Davies K. J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9901, 1987.
8. Garcia-Manzano A, Gonzalez-Llaven J, Lemini C, Rubio-Poo C. Standardization of rat blood clotting test with reagents used for humans. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 44, 153-155, 2001.
9. Guilivi C., Davies K.J.A. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red cell hemoglobin by (the 19S) proteasome. *J. Biol. Chem.*, 268, 8752-8759, 1993.
10. Howe P.E. The determination of fibrinogen by precipitation with sodium sulfate compared with the precipitation of fibrin by the addition of calcium chloride. *J. Biol. Chem.*, 57, 235-240, 1923.
11. Layne E. Spectrophotometric and turbidometric methods for measuring proteins. III. Biuret method. In: Colowick, S.P., and Kaplan, N.O. (Eds.): *Methods in Enzymology*, 3, New York, Academic Press, pp. 450-451, 1957.
12. Levine R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* 258, 11823-11827; 1983.
13. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B-W, Shaltiel S, Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186, 464-78, 1990.
14. Ojeda-May P. and Garcia M.E. Electric field-driven disruption of a native β -sheet protein conformation and generation of a helix-structure. *Biophysical Journal*, 99, 595-599, 2010.
15. Osysko A.P., Muino P.L. Fluorescence quenching of tryptophan and tryptophanyl dipeptides in solution. *J. of Biophys.Chem.*, 2, 3, 316-321, 2011.
16. Pirayazev A.P., Aseichev A.V. and Azizova O.A. Effect of oxidation-modified fibrinogen on the formation and lysis of fibrin clot in the plasma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 148, 6, pp 881-883, 2009.
17. Prütz W.A., Butler J., Land E.J. Phenol coupling initiated by one-electron oxidation of tyrosine units in peptides and histone. *Int. J. Radiat. Biol.*, 44, pp. 183-196, 1983.
18. Reshetnyak Y.K., Burstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The Statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. *Biophysical Journal*, 81, 1710-1734, 2001.
19. Rozenfeld M.A., Leonova V.V., Konstantinova M.L., and Razumovskii S.D. Mechanism of enzymatic crosslinking of fibrinogen molecules. *Biology Bulletin (Biochemistry)*, 35, 6, pp. 578-584, 2008.
20. Shacter E., Williams J.A., and Levine R.L. Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, Issue 4, pp 815-821, 1995.
21. Teale F.W.J. The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *Biochem. J.*, 76, pp. 381-388, 1960.
22. Toschi F., Lugli F., Biscarini F., Zerbetto F. Effects of electric field stress on a β -amyloid peptide. *J. Phys. Chem. B.*, 113, 1, 369-76, 2009.
23. Zhou T., Rosen B.P. Tryptophan fluorescence reports nucleotide-induced conformational changes in a domain of the ArsA ATP-ase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 32, 19731-19737, 1997.

Поступила 05.11.2012