

## РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ПОЛНОГО ВНЕШНЕГО ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ С ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

© 2012 г. Н. Н. Новикова<sup>1,2</sup>, М. В. Ковальчук<sup>1,2</sup>, Э. А. Юрьева<sup>3</sup>, О. В. Коновалов<sup>4</sup>, А. В. Рогачев<sup>1,2</sup>, Н. Д. Степина<sup>2</sup>, В. С. Сухоруков<sup>3</sup>, А. Д. Царегородцев<sup>3</sup>, Е. С. Чухрай<sup>5</sup>, С. Н. Якунин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия  
E-mail: nn\_novikova@crys.ras.ru

<sup>2</sup> Институт кристаллографии РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт педиатрии и детской хирургии МЗ РФ, Москва, Россия

<sup>4</sup> Европейский центр синхротронного излучения (ESRF), Гренобль, Франция

<sup>5</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия

Поступила в редакцию 28.04.2012

Представлены исследования белковых пленок на основе гемоглобина, сформированных на поверхности жидкости. Измерения с помощью метода стоячих рентгеновских волн выполнены на станции ID 10 в центре синхротронного излучения ESRF, а также на станции “Ленгмюр” Курчатовского источника синхротронного излучения. Обнаружено существенное усиление способности белка связывать ионы металлов в результате конформационных перестроек белковых макромолекул, вызванных действием различных повреждающих факторов. Проведены исследования элементного состава белковых препаратов, выделенных у детей и подростков с хроническими обменными заболеваниями, сопровождающимися эндогенной интоксикацией. Получены результаты, свидетельствующие о том, что явление увеличения лигандных свойств белковых молекул, наблюдаемое в модельных экспериментах на белковых пленках, носит общий характер и соответствует процессам, происходящим *in vivo* при нарушении обменных процессов в организме.

### ВВЕДЕНИЕ

Особый интерес к изучению комплексов металлов с белками в биологических системах обусловлен тем исключительным значением, которое имеют металлы для процессов, протекающих в организме человека. Долгое время сохранялся стереотип, что наиболее значимые биохимические функции в организме выполняют натрий, калий, магний и кальций, которые составляют 99% всех атомов металлов в теле человека [1]. Однако в последнее время все большее внимание исследователей привлекают так называемые микроэлементы (железо, молибден, кобальт, медь и цинк), которые содержатся в организме в следовых количествах. Несмотря на малую концентрацию эти атомы играют важнейшую роль в биологических системах прежде всего как активаторы и катализаторы в активных центрах многих ферментов [1–3].

Хотя в настоящее время развит мощный арсенал физико-химических методов, изучение комплексов микроэлементов с белками в биологических системах остается достаточно трудной задачей именно из-за того, что микроэлементы присутствуют в организме в ничтожных количествах. В связи с этим поиск новых подходов, поз-

воляющих напрямую, на молекулярном уровне изучать механизмы образования комплексов металлов с белками, является актуальной задачей, занимающей центральное место в фундаментальных и прикладных исследованиях целого ряда наук, таких как биохимия, микробиология, генетика, медицинская диагностика и т.д.

Принципиально новые возможности для такого рода исследований открывают поверхностно-чувствительные спектрально-селективные рентгеновские методики, благодаря которым удается получать спектрально-селективную информацию об объектах, имеющих наноразмерную организацию.

В проведенных ранее исследованиях [4, 5] метод стоячих рентгеновских волн был применен для изучения элементного состава и молекулярной организации упорядоченных белковых пленок на основе ферментов – щелочной фосфатазы и глюкозооксидазы. Установлено, что в результате конформационных перестроек, вызванных действием различных токсических веществ (тяжелых металлов, мочевины), происходит значительное увеличение способности белковых молекул присоединять ионы металлов. Представленные в этих работах рентгенофлуоресцентные измерения позволили выявить существенные из-

менения элементного состава пленок при обработке белка слабым раствором мочевины (0,09 М), растворами солей свинца и хрома ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М), а также растворами комплексообразующих лекарственных препаратов в высоких концентрациях ( $10^{-3}$ – $10^{-2}$  М). Данные, полученные в модельных экспериментах на белковых пленках, послужили основанием для предположения об изменении элементного состава белков, модифицированных эндотоксинами, которые накапливаются в организме при различных хронических обменных заболеваниях.

Нарушение обменных процессов в организме является причиной целого ряда серьезных хронических заболеваний, в первую очередь атеросклероза — одного из самых распространенных хронических обменных заболеваний человека, которое со временем приводит к таким тяжелым состояниям, как ишемическая болезнь сердца, инфаркты, инсульты. При нарушении обменных процессов в организме токсикантами становятся как патологические продукты обмена (гомоцистеин, средние молекулы), так и физиологические продукты обмена в повышенных дозах (мочевина, мочевая кислота, гормоны, нейромедиаторы, продукты перекисного окисления), а также различные ксенобиотики, включая лекарственные препараты [6]. Под действием таких эндогенных и экзогенных факторов может происходить изменение конформации белковых макромолекул с раскрытием новых адсорбционных центров, что в свою очередь будет приводить к заметному увеличению способности белка связывать ионы металлов. В результате этих изменений снижаются функциональные свойства белковых молекул, они становятся “чужеродными” для организма. К таким “чужеродным” белкам (антигенам) в организме образуются антитела [7], которые могут осаждаться в тканях в виде комплекса антиген–антитело с развитием воспалительного процесса на иммунной основе (воспаление сосудов при атеросклерозе). Кроме того, белковые молекулы с измененной конформацией, несущие на себе захватываемые микроэлементы, могут выключаться из физиологических процессов и удаляться из организма через различные выделительные системы, в частности с мочой. С целью подтверждения гипотезы об усилении лигандных свойств белков при эндогенной интоксикации в организме в настоящей работе проведены исследования белковых препаратов, выделенных из мочи у детей и подростков с различными обменными заболеваниями, сопровождающимися эндогенной интоксикацией.

Высокопрецизионные спектрально-селективные рентгеновские методики использованы для изучения изменений лигандных свойств белков как в модельных системах — белковых пленках на основе гемоглобина, так и в условиях *in vivo* —

белковых препаратах, выделенных у детей и подростков с хроническими обменными заболеваниями.

### РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ В ОБЛАСТИ ПОЛНОГО ВНЕШНЕГО ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОНКИХ ПЛЕНОК

К числу наиболее перспективных поверхностно-чувствительных спектрально-селективных рентгеновских методов следует отнести метод стоячих рентгеновских волн (СРВ) [8]. Исследования тонких пленок, сформированных на полубесконечных подложках, с помощью метода СРВ основаны на одновременном измерении угловой зависимости рентгеновского отражения и интенсивности выхода вторичных излучений (например, характеристической флуоресценции), возникающих при неупругом рассеянии рентгеновских лучей в условиях полного внешнего отражения (ПВО). Основная идея этого метода заключается в том, что форма угловой зависимости выхода вторичных излучений строго зависит от положения атома-источника вторичного излучения внутри пленки. Это дает принципиальную возможность получать информацию о положении атомов определенного сорта внутри пленки напрямую из анализа экспериментальных угловых зависимостей выхода вторичного излучения.

В области ПВО угловая зависимость выхода флуоресценции от тонких пленок имеет характерный вид: кривые монотонно растут, начиная с нулевого значения при  $\theta = 0$  мрад, и достигают максимума вблизи критического угла ПВО для подложки  $\theta_c$  (рис. 1, кривая 1). Такая форма кривых объясняется спецификой волнового поля, которое формируется над поверхностью отражающего рентгеновского зеркала в условиях ПВО благодаря когерентному сложению падающей и отраженной волн. При  $\theta = 0$  мрад разность фаз между падающей и отраженной волнами на поверхности равна  $\pi$ , по мере увеличения угла скольжения разность фаз уменьшается и обращается в ноль вблизи критического угла ПВО. Так как в области ПВО коэффициент отражения остается постоянным и равен единице, изменения фазы волнового поля на величину  $\pi$  должны приводить к резким изменениям интенсивности суммарного волнового поля. При  $\theta = 0$  мрад интенсивность суммарного волнового поля у поверхности равна нулю, вблизи критического угла ПВО — достигает максимума. Таким образом, характерные модуляции, наблюдающиеся в угловой зависимости выхода флуоресценции от тонких пленок в области ПВО, соответствуют интерференционному характеру волнового поля над поверхностью подложки и возникают благодаря изменениям фазы при изменении угла падения. В этом смысле угловую

область ПВО можно назвать фазочувствительной.

Уникальные возможности метода СРВ в области ПВО для изучения структуры и композиционного состава биоорганических пленок на твердой подложке продемонстрированы в [9–11]. Сравнительно недавно благодаря созданию рентгеновских спектрометров, оснащенных ленгмюровской ванной, начался новый этап в развитии метода СРВ [12]. Уже первые работы, в которых метод СРВ использовался для изучения белково-липидных наносистем на поверхности жидкости [13], наглядно продемонстрировали перспективы спектрально-селективной структурной диагностики биоорганических пленок для решения широкого круга биомедицинских задач, так как в этом случае удается проводить исследования молекулярной организации белково-липидных моделей клеточных мембран в условиях, максимально приближенных к условиям функционирования биомембраны в живых клетках.

Еще одна важная с точки зрения спектрально-селективных исследований тонких пленок особенность области ПВО – чрезвычайно малая глубина проникновения рентгеновского излучения в образец. Это свойство является принципиальным для метода рентгенофлуоресцентного анализа в геометрии ПВО (TXRF) – высокопрецизионного метода, позволяющего определять содержание следовых элементов в микроколичествах исследуемых образцов. В таких измерениях раствор пробы наносят в виде тонкого слоя (толщиной не более 100 мкм) на гладкие плоские подложки; характеристические спектры флуоресцентного излучения от образца регистрируют при фиксированном угле падения меньше критического угла ПВО для подложки  $\theta < \theta_c$ . Благодаря тому что в условиях ПВО падающее излучение практически не проникает в подложку, интенсивность фонового излучения удается значительно уменьшить, что позволяет существенно повысить отношение сигнал/шум и заметно снизить пределы обнаружения химических элементов в образце.

Следует подчеркнуть, что в TXRF-измерениях наблюдается совершенно другая форма угловой зависимости выхода флуоресценции в области ПВО (рис. 1, кривая 2): кривые повторяют по форме кривую отражения и не обладают чувствительностью к фазе волнового поля. Такое поведение угловой зависимости объясняется тем, что атомы-источники флуоресценции в нанесенных на подложки пленках образуют большие частицы диаметром больше 100 нм [14]. Хотя в этом случае не удастся получить информацию о местоположении атомов в пленке, но с точки зрения определения концентрации различных элементов в образце такая форма угловых зависимостей является несомненным преимуществом. Очевидно, что корректные данные о концентрации элемен-

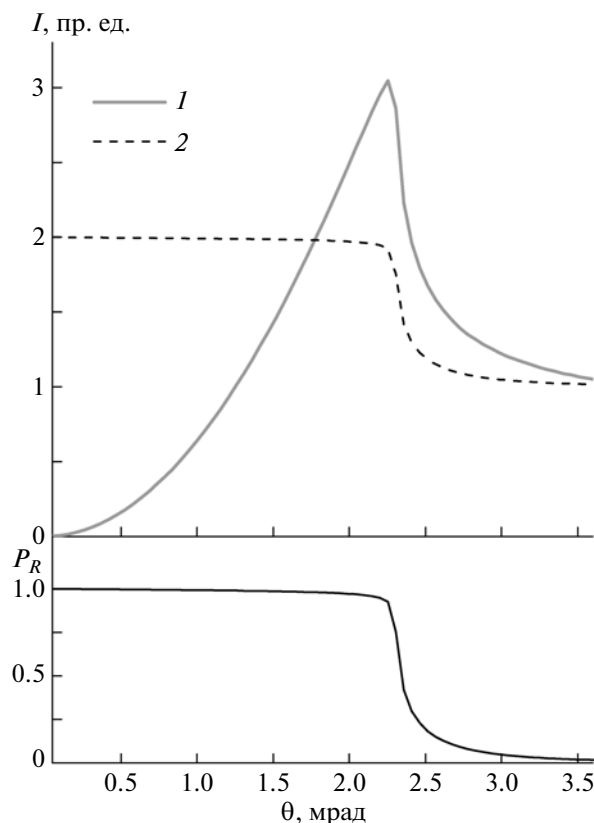


Рис. 1. Расчетные кривые угловой зависимости выхода флуоресценции от тонких пленок для различного типа распределения атомов-источников флуоресцентного излучения в пленке: 1 – атомы-источники флуоресцентного излучения образуют тонкий сплошной слой в пленке; 2 – атомы-источники флуоресцентного излучения образуют большие частицы диаметром больше 100 нм. Нижняя кривая – расчетная угловая зависимости рентгеновского отражения.

тов можно получить только в том случае, если угловая зависимость выхода флуоресценции имеет форму  $1 + P_R$ , т.е. остается постоянной в области  $\theta < \theta_c$ , в противном случае количественные оценки будут зависеть от угла падения рентгеновского пучка на образец.

В исследованиях, представленных в настоящей работе, использованы обе описанные выше методики (метод стоячих рентгеновских волн и метод TXRF), что позволило определить элементный состав как для тонких белковых пленок, сформированных на поверхности жидкости, так для белковых препаратов, выделенных у детей и подростков с хроническими обменными заболеваниями.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Формирование белковых пленок на основе гемоглобина на поверхности жидкости.** Для исследований использовались: препарат белка гемоглобин

в виде лиофилизированного порошка (Sigma); мочевины (Sigma); октадециламина (Sigma).

При формировании пленок методом адсорбции белка на ленгмюровском монослое поверхностно-активного соединения (измерения на источнике ESRF) водный раствор гемоглобина (концентрации 9 мг/л) помещали в ленгмюровскую ванну. Затем на поверхность этой субфазы наносили раствор октадециламина в хлороформе (0.5 мг/мл). Монослой октадециламина поджигали до поверхностного давления 20 мН/м. Рентгеновские измерения начинали через 40 мин. Поверхностное давление слоя поддерживалось постоянным в процессе рентгеновских измерений.

При формировании пленок на границе раздела воздух/водная субфаза (измерения на Курчатовском источнике) водный раствор гемоглобина (концентрации 9 мг/л) помещали в ленгмюровскую ванну. Рентгеновские измерения начинали через 40 мин.

**Рентгенофлуоресцентные измерения в условиях полного внешнего отражения.** Рентгенофлуоресцентные измерения белковых пленок, сформированных на поверхности водной субфазы, проведены на станции ID10 в центре синхротронного излучения ESRF (Франция), а также на станции "Ленгмюр" Курчатовского источника синхротронного излучения. Падающий и отраженный пучки находились в вертикальной плоскости. Характеристические спектры флуоресцентного излучения записывали для углов падения, меньших критического угла полного внешнего отражения для воды. Энергодисперсионный флуоресцентный детектор VORTEX располагался над поверхностью водной субфазы под углом 90°. При измерениях на станции ID10 в центре синхротронного излучения ESRF для монохроматизации падающего пучка использовался двухкристальный монохроматор с алмазными кристаллами-монохроматорами. Пучок отклонялся от горизонтальной плоскости и направлялся на поверхность образца под заданным углом вращением отклоняющего кристалла (Ge). В экспериментах на станции "Ленгмюр" Курчатовского источника синхротронного излучения использовался пучок из поворотного магнита, монохроматизированный двухкристальным кремниевым монохроматором. От горизонтальной плоскости пучок отклонялся при помощи пары плоских зеркал. Установка заданного угла падения рентгеновского пучка на поверхность жидкости осуществлялась наклоном второго зеркала с вольфрамовым покрытием. Энергия падающего пучка составляла 13.4 кэВ в измерениях на станции ID10 и 12.5 кэВ – на станции "Ленгмюр".

Исследования элементного состава белковых препаратов, выделенных у детей и подростков с обменными заболеваниями, были выполнены на лабораторном рентгеновском спектрометре

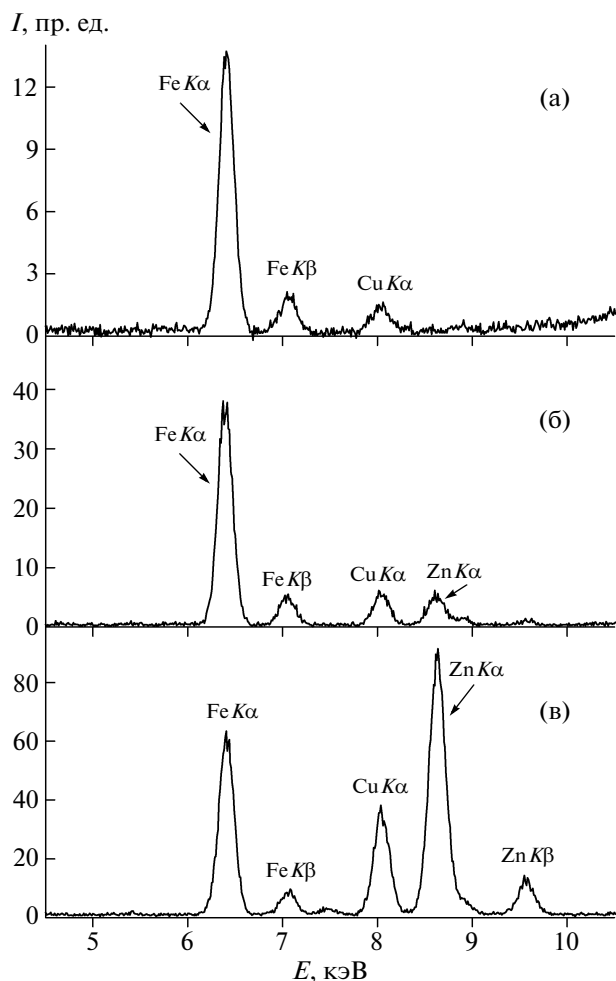
PICOFOX S2 (компания Bruker), оснащенном рентгеновской трубкой с Mo-анодом и воздушным охлаждением.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

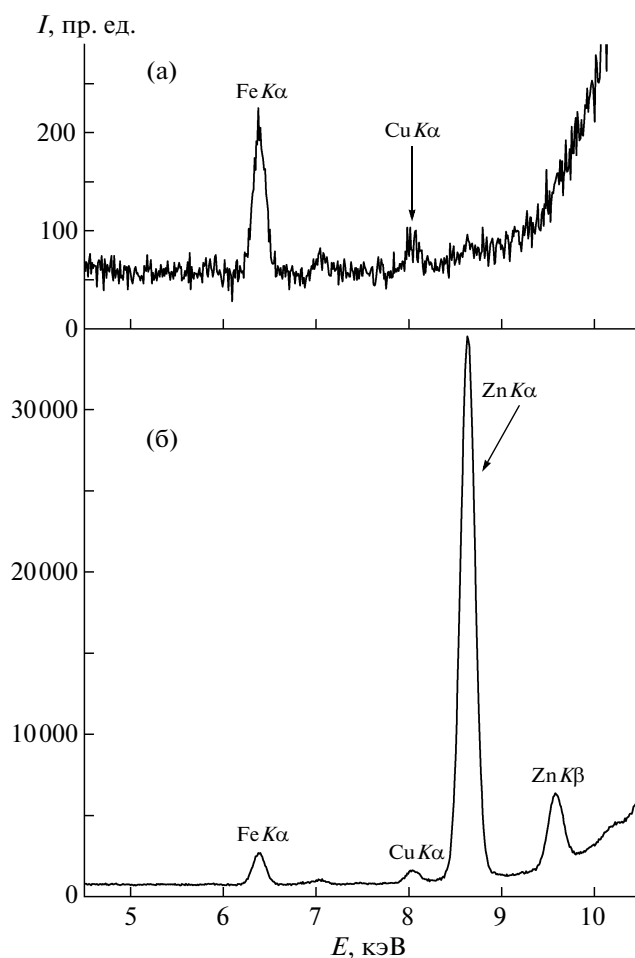
**Рентгенофлуоресцентные исследования белковых пленок на жидкости.** В настоящем разделе приведены данные рентгенофлуоресцентных исследований белковых пленок на основе гемоглобина, сформированных на поверхности жидкости. Серия измерений, выполненных на станции ID10 в центре синхротронного излучения ESRF, посвящена исследованию изменений элементного состава белковых пленок на основе гемоглобина под действием мочевины. Токсическое действие мочевины в организме человека хорошо известно; повышение уровня мочевины в крови происходит при нарушении обменных процессов у больных с хронической почечной недостаточностью. Обработку гемоглобина мочевиной проводили по следующей схеме: в раствор белка добавляли мочевины, ее концентрация в рабочем растворе составляла 0.09 М и 0.17 М, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 12 ч. Отметим, что концентрация мочевины в растворе была достаточно низкой, обычно для денатурации белковых молекул используется раствор мочевины концентрации ~8 М.

Для формирования белковых пленок использовался метод адсорбции белка на ленгмюровском монослое поверхностно-активного вещества (октадециламин), сформированном на поверхности жидкости. На рис. 2 приведены характеристические спектры флуоресцентного излучения от смешанных белковых пленок на основе гемоглобина, подвергнутого действию мочевины, а также от контрольной пленки на основе гемоглобина без какой-либо предварительной обработки. Спектры были записаны вблизи критического угла ПВО для воды, где интенсивность выхода флуоресценции от белковой пленки достигала максимального значения. Хорошо видно, что в результате действия мочевины произошло заметное изменение элементного состава пленок. На спектре от контрольной пленки присутствует пик от ионов железа, связанных в активных центрах гемоглобина (рис. 2а), а также слабый пик от меди. На спектрах от пленок на основе белка, подвергнутого действию мочевины, заметно выросла интенсивность пика от меди, и, кроме того, появился интенсивный пик от цинка (рис. 2б, 2в). Причем в том случае, когда белок был обработан раствором мочевины более высокой концентрации, интенсивность пика от ионов Zn существенно увеличилась.

В измерениях, проведенных на станции "Ленгмюр" на Курчатовском источнике синхротронного излучения, изучались изменения эле-



**Рис. 2.** Характеристические спектры флуоресцентного излучения от белковых пленок на основе гемоглобина, сформированных на поверхности жидкости: а – контрольные измерения; б – белковая пленка на основе гемоглобина, подвергнутого действию мочевины концентрации 0.09 М; в – белковая пленка на основе гемоглобина, подвергнутого действию мочевины концентрации 0.17 М. Измерения на станции ID10 в центре синхротронного излучения ESRF.

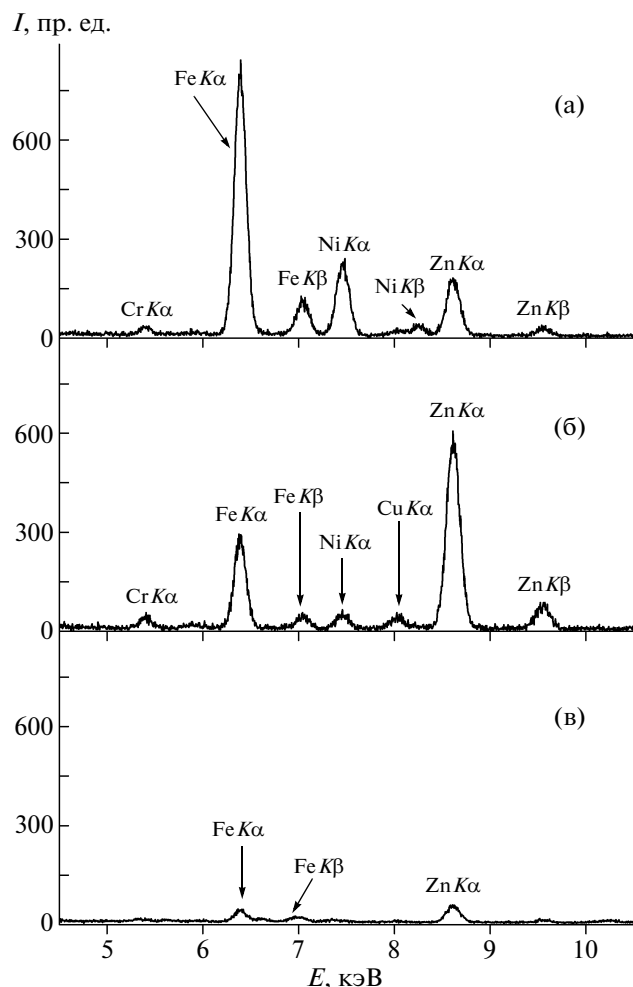


**Рис. 3.** Характеристические спектры флуоресцентного излучения от белковых пленок на основе гемоглобина, сформированных на поверхности водной субфазы: а – контрольные измерения; б – белковая пленка на основе гемоглобина после длительного хранения белкового раствора. Измерения на станции “Ленгмюр” Курчатовского источника синхротронного излучения.

ментного состава пленок на основе гемоглобина в результате денатурации при длительном хранении раствора белка. В этих экспериментах также были выполнены контрольные измерения от пленки, сформированной на основе необработанного белка. При этом использовалась только половина (0.5 л) приготовленного раствора гемоглобина. Оставшуюся часть раствора белка хранили при комнатной температуре в течение 2 месяцев, а затем провели рентгенофлуоресцентные измерения, сформировав белковую пленку так же, как и в контрольном эксперименте. Результаты измерений показаны на рис. 3. Спектры были записаны вблизи критического угла ПВО для воды. Как и в исследованиях, выполненных на ESRF, обнаружено изменение элементного состава бел-

ковой пленки: после длительного хранения белка на спектрах появились пики от ионов Cu и Zn. Примечательно, что элементный состав примесей, обнаруженных в белковых пленках в экспериментальных измерениях на ESRF и на Курчатовском источнике синхротронного излучения, оказался идентичным – это ионы меди и цинка, причем в обоих случаях пик  $ZnK_{\alpha}$  оказался наиболее интенсивным.

Следует подчеркнуть, что в представленных исследованиях для приготовления всех рабочих белковых растворов использована вода высокой степени очистки (сопротивление >18 мОм/см), полученная на установке Millipore Corp.

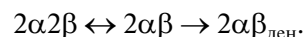


**Рис. 4.** Характеристические спектры флуоресцентного излучения от белковых препаратов, выделенных у детей и подростков с хроническими обменными заболеваниями различной степени тяжести: а, б — данные для детей с тяжелыми генетическими заболеваниями; в — для ребенка с изолированным синдромом умственной отсталости.

Полученные данные об изменении элементного состава белковых пленок можно объяснить увеличением доступности адсорбционных центров на молекуле гемоглобина при изменении конформации белковых макромолекул, произошедших под действием мочевины (в измерениях на ESRF) или в результате длительного хранения белка (в измерениях на Курчатовском источнике).

Гемоглобин — основной переносчик кислорода млекопитающих и локализован в эритроцитах (30–40% белков клетки). Белок состоит из четырех глобул двух видов — две  $\alpha$ -субъединицы и две  $\beta$ -субъединицы [15]. Каждая субъединица содержит простетическую группу — гем, в котором присутствует один ион железа. При длительном хранении при комнатной температуре молекулы ге-

моглобина диссоциируют на два димера  $\alpha\beta$ , которые затем медленно денатурируют



При этом открывается довольно большой по площади контактный участок, который стабилизирует тетрамер. Эти конформационные изменения приводят к тому, что становятся стерически доступными аминокислотные остатки с функциональными группами, которые обладают высокой способностью координировать ионы металлов и могут образовывать комплексы с ионами металлов при низком содержании этих ионов в субфазе [1]. Повышение адсорбционной способности гемоглобина после обработки раствором мочевины, по-видимому, объясняется тем, что под действием мочевины приповерхностная структура белка разрушается в результате разрыва структурообразующих водородных связей и происходит активное проникновение молекул воды. Возникает новое конформационное состояние белка *molten globule* — расплавленная глобула. На поверхности расплавленной глобулы гемоглобина появляется большое количество аминокислотных остатков, способных связать присутствующие в растворе ионы металлов. Очевидно, что набор ионов металлов, связанных белковой молекулой, должен определяться специфическим для данного белка расположением аминокислотных остатков и поэтому не должен зависеть от характера повреждающего действия, вызвавшего конформационные изменения белковой молекулы. Именно поэтому представленные в настоящем разделе рентгенофлуоресцентные измерения, проведенные с использованием различных повреждающих факторов, показали полную идентичность элементного состава белковых пленок на основе гемоглобина.

**Рентгенофлуоресцентные исследования белковых препаратов.** Для исследования элементного состава белковых препаратов использован метод рентгенофлуоресцентного анализа в геометрии ПВО. Были выполнены рентгенофлуоресцентные измерения белковых препаратов, выделенных из суточной мочи у детей и подростков, находившихся на лечении в НИИ педиатрии и детской хирургии. Обследовано 340 больных с различными наследственными и приобретенными патологиями, включая генетические, сердечно-сосудистые, почечные и желудочно-кишечные заболевания. В норме за сутки у человека с мочой выделяется 40–150 мг белка, при почечных заболеваниях эта величина возрастает до 1–2 г; для выделения белков использовался метод концентрирования с помощью осаждения ацетоном [16].

Типичные характеристические спектры флуоресцентного излучения приведены на рис. 4, 5. Наглядное представление о различиях микроэле-

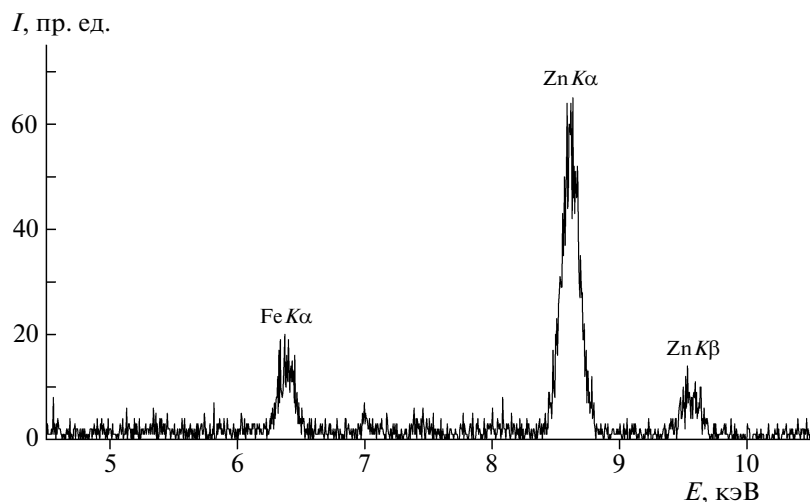


Рис. 5. Характеристический спектр флуоресцентного излучения от белкового препарата, состоящего на 83% из альбумина.

ментного состава белков мочи можно получить из сравнения спектров для детей с генетическими заболеваниями различной степени тяжести: на рис. 4а и 4б показаны данные для близких родственников – брата (6 лет) и сестры (8 лет) с синдромом Лоуренса–Муна–Барде–Бидля – тяжелого генетического заболевания, которое сопровождается прогрессирующим нарушением обменных процессов. Биохимический анализ мочи у этих детей выявил множественные признаки эндогенной интоксикации – снижение антиоксидантной защиты; повышение фибриногена; увеличение экскреции с мочой средних молекул, перекисей липидов, гликозаминогликанов; признаки снижения биоэнергетики. На рис. 4в представлены данные для девочки (4 лет) с синдромом олигофрении: задержка психомоторного развития, умственная отсталость без пороков развития органов и изменений в биохимических показателях мочи. Хорошо видно, что у детей с тяжелой генетической патологией, сопровождающейся выраженными обменными нарушениями (рис. 4а и 4б), в белковых препаратах присутствует достаточно большое количество ионов железа и цинка. У ребенка с изолированным синдромом умственной отсталости без явных признаков нарушения обмена веществ количество железа и цинка в белковых препаратах оказалось значительно меньше (рис. 4в).

Дополнительные исследования методом электрофореза белковых фракций показали, что в белковых препаратах преобладает фракция альбумина (~70%), реже выявлялись фракции глобулинов с молекулярным весом более или менее 70 кДа. На рис. 5 приведен спектр от белкового препарата, в котором фракция альбумина составляла 83%, т.е. практически весь выделенный бе-

лок представлял собой альбумин. На этом спектре также хорошо различимы пики от железа и цинка, что указывает на конформационные перестройки белковых молекул, так как в нативном состоянии альбумин не содержит ионов металлов. Отметим, что в [17] методом флуоресцентных зондов проведены исследования функционального состояния альбумина, выделенного из сыворотки крови у пациентов с заболеваниями, сопровождающимися эндогенной интоксикацией различной степени тяжести. Согласно данным, полученным в этих исследованиях, при эндогенной интоксикации наблюдается заметное снижение транспортных функций альбумина, что свидетельствует об изменении конформации белковых макромолекул.

Следует подчеркнуть, что у большинства из 340 обследованных детей на спектрах были зарегистрированы пики от ионов железа и цинка различной интенсивности в зависимости от степени эндогенной интоксикации. Причем с возрастом содержание железа и цинка в белковых препаратах заметно повышалось, что, по-видимому, связано с постепенным нарастанием эндогенной интоксикации.

Одним из возможных объяснений присутствия ионов металлов в белковых препаратах, обнаруженного в настоящих исследованиях, является “освобождение” организма от белков, модифицированных токсикантами и ставших чужеродными для организма. Как было отмечено во введении, среди факторов, способствующих развитию хронических обменных заболеваний, общим является накопление в организме избыточных количеств токсических продуктов обмена веществ, которые могут вызывать конформационные перестройки белковых макромолекул, что

в свою очередь приводит к заметному увеличению способности белка связывать ионы металлов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования элементного состава белковых пленок на основе гемоглобина, сформированных на поверхности жидкости. Измерения методом стоячих рентгеновских волн в условиях полного внешнего отражения позволили обнаружить существенное усиление способности белка связывать ионы металлов в результате конформационных перестроек белковых макромолекул, вызванных действием различных повреждающих факторов.

Данные об изменении элементного состава белковых пленок, представленные в настоящей работе, а также в более ранних экспериментах [4, 5], послужили основанием для предположения об увеличении лигандных свойств белков, модифицированных эндотоксинами, накапливающимися в организме при обменных заболеваниях. Исследования элементного состава белковых препаратов, выделенных у детей и подростков с хроническими обменными заболеваниями, были выполнены с помощью метода рентгенофлуоресцентного анализа в геометрии полного внешнего отражения (TXRF). Присутствие ионов металлов (железа и цинка) зарегистрировано практически во всех исследованных образцах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что явление увеличения лигандных свойств белковых молекул, наблюдаемое в модельных экспериментах на белковых пленках, носит общий характер и соответствует процессам, происходящим *in vivo* при нарушении обменных процессов в организме. Это в свою очередь указывает на необходимость пересмотра существующих представлений о причинах нарушения микроэлементного состава отдельных органов и тканей при обменных заболеваниях.

Авторы выражают благодарность Е.В. Раковой за ценные советы и замечания.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уильямс Д. Металлы жизни. М.: Мир, 1975. 236 с.
2. Авцин А.П., Жаворонков А.А., Рущ М.А. Микроэлементы человека. М.: Медицина, 1991. 496 с.
3. Скальный А.В. Микроэлементозы человека. М.: Научный Мир, 1999. 96 с.
4. Novikova N.N., Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V. et al. // Crystallography Reports. 2009. V. 54. P. 1208.
5. Новикова Н.Н., Ковальчук М.В., Степина Н.Д. и др. // Поверхность. Рентген., синхротрон. нейтрон. исслед. 2011. № 9. С. 6.
6. Куценко С.А. Основы токсикологии. С-Пб.: Фолиант, 2004. 716 с.
7. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М. Контроль и регуляция иммунного ответа. Л.: Медицина, 1981. 313 с.
8. Ковальчук М.В., Кон В.Г. // УФН. 1986. Т. 149. С. 69.
9. Bedzyk M., Bilderback D., Bommarito G. et al. // Science. 1988. V. 241. P. 1788.
10. Wang J., Wallace C., Clark-Lewis I. et al. // J. Mol. Biol. 1994. V. 237. P. 1.
11. Novikova N.N., Yur'eva E.A., Zheludeva S.I. et al. // J. Synchrotron Rad. 2005. V. 12. P. 511.
12. Bloch J., Sansone M., Rondelez F. // Phys. Rev. Lett. 1985. V. 54. P. 1039.
13. Zheludeva S., Novikova N., Stepina N. et al. // Spectrochim. Acta B. 2008. V. 63. P. 1339.
14. Klockenkämper R. Total-reflection X-ray fluorescence analysis. New York: Wiley, 1997. 245 p.
15. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Principles of biochemistry. Second edition. New York: Worth, 1993. 1013 p.
16. Юрева Э.А., Длин В.В. Диагностический справочник нефролога. М.: Оверлей, 2007. 355 с.
17. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Москва: Ириус, 1994. 226 с.