

**ВОЗМОЖНОСТИ РЕНТГЕНОВСКОЙ АБСОРБЦИОННОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ В ГЕОМЕТРИИ ПОЛНОГО ВНЕШНЕГО
ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ПЛЕНОК
НА ЖИДКОСТИ**

© 2019 г. Н. Н. Новикова^{1,*}, С. Н. Якунин¹, М. В. Ковальчук¹, Э. А. Юрьева², Н. Д. Степина³,
А. В. Рогачев¹, М. А. Кременная⁴, Г. Э. Яловега⁴, О. В. Космачевская⁵, А. Ф. Топунов⁵

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

² Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, Москва, Россия

³ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

⁴ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

⁵ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

* E-mail: nn-novikova07@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.06.2019 г.

После доработки 11.06.2019 г.

Принята к публикации 25.06.2019 г.

Впервые экспериментально получены XANES-спектры белковых пленок (гемоглобина и щелочной фосфатазы), сформированных на поверхности жидкой субфазы в ленгмюровской ванне. Возможности рентгеновской абсорбционной спектроскопии в геометрии полного внешнего отражения продемонстрированы на примере исследования белковой пленки на основе гемоглобина, подвергнутого действию мочевины. Установлено, что присутствие в субфазе 0.09 М раствора мочевины значительно усиливает способность гемоглобина связывать ионы цинка и железа. Получена информация о локальном атомном окружении ионов цинка, присоединенных к молекуле гемоглобина. Показано, что каждый ион цинка координируют четыре лиганда, два из которых – аминокислотные остатки цистеина и гистидина. Сформулированы общие представления о молекулярных механизмах накопления ионов металлов под действием повреждающих факторов.

DOI: 10.1134/S0023476119060134

ВВЕДЕНИЕ

Рентгеновская спектроскопия поглощения является одним из наиболее информативных методов изучения локальной структуры вещества. Рентгеновские спектры поглощения обычно делят на две части: окологороговая тонкая структура рентгеновского спектра поглощения (*X-ray absorption near edge structure* – XANES) и протяженная тонкая структура рентгеновского спектра поглощения (*extended X-ray absorption fine structure* – EXAFS). Анализ особенностей XANES-спектров позволяет определять координаты окружающих атомов, межатомные расстояния (длины химических связей), локальную симметрию окружения поглощающего атома (валентные углы химической связи). Также с помощью XANES-измерений можно получить информацию об энергии вакантных молекулярных орбиталей в молекулах или электронных зон в конденсированных веществах, лежащих выше уровня Ферми, распределе-

нии электронной плотности на атомах, а также степени окисления поглощающего атома [1, 2].

Метод XANES-спектроскопии неоднократно применялся для исследования локального окружения металлов в активных центрах металлопротеинов [3, 4]. Новые возможности для изучения объектов с крайне низкой концентрацией поглощающих атомов, таких как металлопротеины, открывают измерения XANES-спектров во флуоресцентной моде в условиях полного внешнего отражения (ПВО). В этом случае высокую чувствительность обеспечивает скользящая геометрия взаимодействия рентгеновского пучка с поверхностью: благодаря малой глубине проникновения рентгеновского излучения в подложку в условиях ПВО значительно снижается интенсивность фонового излучения подложки. Особый интерес представляют XANES-измерения для изучения белковых пленок, сформированных на поверхности жидкости, когда не нарушается на-

тивная конформация белковых молекул, а следовательно, сохраняются их биологические функции.

В представленной работе метод XANES-спектроскопии был использован для изучения пленок гемоглобина, сформированных на поверхности водной субфазы в ленгмюровской ванне. Исследования посвящены выявлению механизмов изменения способности белковых молекул связывать металлы в условиях, моделирующих эндогенную интоксикацию в организме. Известно, что белки при нарушении пространственной структуры приобретают способность образовывать комплексы с переходными металлами (Zn, Fe, Cd, Ni), в результате в клетке могут возникать стабильные белковые агрегаты со сниженной функциональной активностью [5, 6]. Эндогенная интоксикация, сопровождающая хронические обменные заболевания, является важным фактором, оказывающим влияние на структурно-функциональные свойства белков в организме. Возникающие при тяжелых обменных заболеваниях посттрансляционные модификации белковых молекул, такие как нитрозилирование, гликирование, алкилирование, карбомилирование и другие, могут запускать в организме целый каскад событий с риском развития разнообразных ассоциированных аутоиммунных заболеваний [7, 8].

В настоящей работе представлены результаты исследования действия одного из наиболее известных “уремических” токсикантов – мочевины – на гемоглобин. Выбор гемоглобина, который относится к важнейшим транспортным белкам крови, обусловлен тем, что при развитии синдрома эндогенной интоксикации в организме в той или иной степени нарушается функционирование практически всех его физиологических систем, причем в первую очередь это касается системы крови, выполняющей в организме интегративные функции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование белковых пленок на поверхности водной субфазы

В работе были использованы: гемоглобин человека в виде лиофилизированного порошка; щелочная фосфатаза из свиной почки в виде лиофилизированного порошка; мочевины; соль $ZnCl_2$. Все реактивы производства Sigma, США.

Пленки на основе щелочной фосфатазы. Водный раствор щелочной фосфатазы (концентрация 4 мг/л) помещали в ленгмюровскую ванну. Рентгеновские измерения начинали через 1.5 ч, когда поверхностное давление достигло значения 15 мН/м.

Пленки на основе гемоглобина. Водный раствор гемоглобина (концентрация 9 мг/л) помещали в

ленгмюровскую ванну. Рентгеновские измерения начинали через 1.5 ч, когда поверхностное давление достигло значения 23 мН/м.

Рентгеновские измерения

XANES-спектры белковых пленок, сформированных на поверхности жидкости, измеряли на станции “Ленгмюр” Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований (Москва, Россия). В экспериментах использовано синхротронное излучение (СИ) из поворотного магнита, двухкристальный монохроматор Si(111) обеспечивал степень монохроматизации первичного пучка СИ на уровне спектральной ширины порядка 3 эВ. Наклон пучка к поверхности жидкости осуществляли при помощи двух плоских зеркал. Угол падения излучения на поверхность воды поддерживали постоянным, он составлял 0.8 от критического угла ПВО для воды θ_c . Флуоресцентное излучение регистрировали с помощью дрейфового детектора VORTEX, расположенного над поверхностью водной субфазы под углом 90°. Для обеспечения хорошей статистики при измерении сигнала от белковой пленки была использована многопроходная методика измерения с последующим усреднением серии спектров. Воспроизводимость энергетического положения монохроматора при многократном сканировании составила 0.18 эВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение изменений элементного состава пленки гемоглобина

Пленки на основе гемоглобина, обработанного мочевиной. Обработку гемоглобина мочевиной проводили по следующей схеме: в раствор белка добавляли мочевины до конечной концентрации 0.09 М, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем раствор помещали в ленгмюровскую ванну. Были выполнены две серии измерений: в первом случае конечная концентрация мочевины в рабочем растворе составляла 0.09 М, во второй серии концентрация была выше – 0.2 М. В качестве контроля были проведены исследования пленки интактного гемоглобина. Характеристические спектры флуоресцентного излучения при фиксированном угле $\theta \leq \theta_c$ записывали непрерывно в течение 24 ч. За время измерений наблюдалось постепенное увеличение интенсивности выхода флуоресценции как ионов цинка, так и ионов железа.

Для количественной оценки содержания ионов металлов, связанных молекулами белка, удобно использовать в качестве реперного значения интенсивность выхода флуоресценции ионов серы, которые присутствуют в аминокислотных остатках цистеина и метионина. Относительное

количество ионов металлов $R_{Me/S}$ можно определить из отношения металл–сера, сравнив интенсивность пика SK_{α} и интенсивность пика металла (ZnK_{α} или FeK_{α}). В гемоглобине человека в одной молекуле (тетрамер) присутствуют 12 ионов серы и четыре иона железа, в соответствии с этим отношение количества ионов железа к количеству ионов серы должно быть 1 : 3 ($R_{Fe/S} = 0.33$). Максимальные значения параметра $R_{Fe/S}$, зафиксированные в конце измерений каждой серии, приведены в табл. 1. Весьма примечательным является повышенное отношение железа к сере, которое оказалось больше номинального даже в случае интактного гемоглобина. Это наблюдение указывает на то, что в ходе экспериментов в молекулах гемоглобина появились дополнительные Fe-связывающие сайты (помимо протетической группы). Отметим, что в экспериментах, проведенных в присутствии мочевины, содержание ионов металлов (цинка или железа) зависело от концентрации мочевины – чем выше концентрация мочевины, тем выше количество связанных металлов.

Были выполнены контрольные исследования лиофилизированного порошка гемоглобина, использованного в исследованиях, с помощью метода рентгенофлуоресцентного анализа в геометрии ПВО на лабораторном спектрометре PICO-FOX (Bruker). Согласно этим результатам $R_{Fe/S} = 0.32$, что соответствует номинальному значению. Отметим, что в этих измерениях сигнал Zn-флуоресценции не был обнаружен.

Пленки на основе гемоглобина, обработанного раствором соли $ZnCl_2$. Проведенные исследования позволили сравнить скорость связывания цинка белковыми молекулами в водном растворе и на границе раздела воздух–вода. В этой серии измерений к раствору гемоглобина предварительно добавляли раствор соли $ZnCl_2$. Конечная концентрация соли в белковом растворе составила 3×10^{-7} М, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч. Половину этого раствора помещали в ленгмюровскую ванну, после формирования белковой пленки записывали характеристические спектры флуоресцентного излучения при фиксированном угле $\theta \leq \theta_C$ в течение 24 ч. За это время интенсивность пиков, соответствующих ионам цинка и железа, постепенно росла, и в конце эксперимента соотношение $R_{Zn/S}$ и $R_{Fe/S}$ достигло значения 67.2×10^{-3} и 0.470 соответственно. Оставшуюся часть раствора белка хранили в колбе при комнатной температуре 20 ч, в течение которых проводили измерения первой порции раствора. Затем из этого раствора формировали белковую пленку в ленгмюровской ванне и проводили измерения. Характеристические спектры флуоресцентного излучения при фикси-

Таблица 1. Максимальное значение отношения металл–сера, зафиксированное за 24 ч измерений пленки гемоглобина, сформированного на границе воздух–жидкость

Отношение металл–сера	Контрольные измерения	Концентрация мочевины	
		0.09 М	0.2 М
$R_{Zn/S}$	6.3×10^{-3}	27.3×10^{-3}	42.0×10^{-3}
$R_{Fe/S}$	0.436	0.545	0.562

рованным угле $\theta \leq \theta_C$ записывали в течение 30 мин после формирования белковой пленки. Оказалось, что в этом случае $R_{Zn/S} = 21 \times 10^{-3}$ и $R_{Fe/S} = 0.344$. Проведенные измерения позволили сравнить скорости связывания металла с гемоглобином в двух разных случаях: когда молекулы белка расположены в пленке на границе воздух–жидкость или присутствуют в объеме раствора. Согласно полученным результатам процесс накопления металла протекал значительно интенсивнее в пленке гемоглобина на границе. В частности, количество ионов цинка, связанных с молекулами гемоглобина на границе воздух–жидкость, увеличилось в 3 раза быстрее, чем в объеме за то же время.

Обсуждая представленные в разделе результаты, следует подчеркнуть, что во всех экспериментах для приготовления белковых растворов была использована вода высокой степени очистки (Millipore Corp). Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при обработке мочевиной гемоглобин приобретает свойство связывать ионы металлов, содержащиеся в воде в следовых количествах. Кроме того, исследования изменения элементного состава белковых пленок во времени позволили выявить еще один фактор, имеющий важное значение для связывания ионов металлов: пребывание белковых молекул на границе раздела воздух–вода значительно ускоряет этот процесс. Было отмечено накопление во времени ионов цинка и железа на интактном белке, не подверженном какой-либо обработке. Однако в случае предварительного воздействия на белок повреждающего фактора (мочевины) процесс присоединения ионов металлов на гемоглобине заметно ускорился.

Информацию о локальном окружении ионов цинка, связанных с молекулой гемоглобина, удалось получить в серии измерений с помощью метода рентгеновской абсорбционной спектроскопии в геометрии ПВО.

Исследования пленок гемоглобина и щелочной фосфатазы методом рентгеновской абсорбционной спектроскопии в геометрии ПВО

Пленки на основе гемоглобина, обработанного мочевиной. Сразу после формирования слоя гемо-

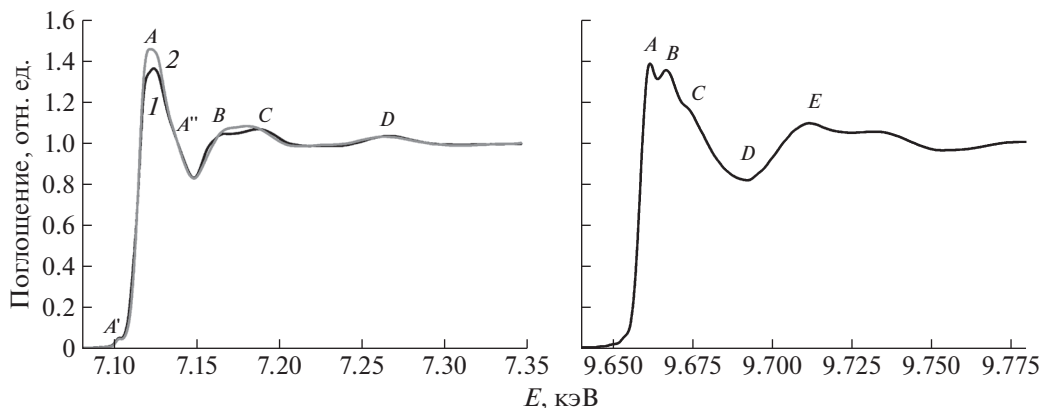


Рис. 1. Экспериментальные XANES-спектры вблизи K -края поглощения железа (а) и цинка (б) пленки гемоглобина, сформированной в лентгмюровской ванне на поверхности водной субфазы, содержащей мочевины.

глобина на поверхности водной субфазы были проведены XANES-измерения за K -краем поглощения железа. Затем под сформированный слой гемоглобина добавляли раствор мочевины до концентрации 0.09 М. Слой инкубировали в течение 24 ч на поверхности водной субфазы, содержащей мочевины, после этого концентрацию мочевины в водной субфазе увеличили до 0.2 М. Спустя 24 ч после повторного введения мочевины были измерены XANES-спектры за K -краем поглощения железа и цинка. К началу этих измерений интенсивность пика цинка достигла достаточно высокого значения (отношение $R_{Zn/S}$ составило 84×10^{-3}), все зарегистрированные спектры XANES показали высокое отношение сигнал/фон и хорошо разрешенную тонкую структуру.

На рис. 1а представлены экспериментальные спектры XANES за K -краем поглощения железа для пленки гемоглобина на поверхности водной субфазы до (кривая 1) и после (кривая 2) введения мочевины. Форма XANES-спектра необработанного гемоглобина совпадает с экспериментальными данными [9, 10] для окисленных форм гемоглобина и миоглобина. На рис. 1а хорошо видна особенность, обозначенная как A'' , которая соответствует метгемоглобину. После добавления в водную субфазу мочевины в спектре наблюдаются рост интенсивности и изменение формы “белой линии” A , а также перераспределение интенсивностей и изменение энергетического положения особенностей B и C . Наряду с этим остаются без изменений энергетическое положение края поглощения и энергетическое положение и интенсивность предкраевого пика A' , а также пиков A' и D . Известно, что энергетическое положение края поглощения (E_0) спектров XANES часто используется для определения степени окисления атомов. Однако в случае гемоглобина и миоглобина использование E_0 для определения степени окисления атомов железа не дает точных ре-

зультатов, так как электронная структура атома железа в этих случаях сильно зависит от спинового состояния самого железа и химического характера лигандов [9, 11]. Поэтому только на основе идентичности энергетического положения края поглощения железа в гемоглобине до и после обработки мочевиной нельзя однозначно утверждать, что степень окисления железа в геме осталась неизменной. Предкраевая особенность A' образуется в результате смешивания молекулярных орбиталей $3d-4p$. В этом случае разрешен квадрупольный переход $1s \rightarrow 3d$, запрещенный в октаэдрической координации, но разрешенный для тетраэдра и искаженного октаэдра [12]. На интенсивность предкраевого пика и его энергетическое положение влияют природа лигандов, симметрия окружения и степень окисления атомов железа. В спектрах необработанного и обработанного мочевиной гемоглобина наблюдаются эквивалентные по энергетическому положению и интенсивности предкраевые особенности. Кроме того, в [13] было показано, что простое синусоидальное поведение особенностей B и C соответствует искаженной октаэдрической симметрии первой координационной сферы атома железа. Если учесть, что исходный гемоглобин находится в аквамет-форме ($Hb-Fe^{III}-H_2O$), характеризующейся симметрией искаженного октаэдра, то можно предположить, что симметрия окружения атома железа в гемоглобине при обработке мочевиной не изменяется.

Однако остается открытым вопрос о причинах увеличения интенсивности белой линии и перераспределения интенсивностей пиков B и C после введения в субфазу мочевины. Возможно, наблюдаемые трансформации связаны с тем, что в присутствии мочевины изменяется локальная геометрия ионов железа в простетической группе. С другой стороны, увеличение интенсивности Fe-пиков в спектрах характеристической флуо-

ресценции, обнаруженное в предыдущей серии измерений, свидетельствует о формировании на молекулах гемоглобина дополнительных центров связывания железа помимо гема, локальное окружение которых отличается от гемовой группы. Очевидно, что наблюдаемые различия в XANES-спектрах гемоглобина обусловлены тем фактом, что регистрируемые спектры представляют собой сумму вкладов ионов железа гемовой группы и дополнительных центров связывания.

Анализ интенсивности “белой линии” XANES-спектра ионов цинка, связанных молекулами гемоглобина (рис. 16), показывает, что координационное число (КЧ) Zn^{2+} в обработанном мочевиной гемоглобине соответствует четырем. Такой вывод может быть сделан из сравнения интенсивности белой линии экспериментального спектра XANES, полученного в настоящей работе, с данными [14, 15]. В этих работах на основе анализа интенсивности экспериментальных и теоретических XANES-спектров атомов Zn с КЧ 4, 5 и 6 в мононуклеарных модельных соединениях цинка было показано, что интенсивность белой линии возрастает с увеличением КЧ. Так, в случае тетраэдрического окружения цинка максимум интенсивности белой линии не превышает 1.5, а для КЧ = 5 и 6 интенсивность не опускалась ниже 1.6. В настоящем эксперименте интенсивность белой линии составила 1.4, что указывает на тетраэдрическое окружение ионов Zn^{2+} .

Для определения наиболее вероятного места связывания цинка был использован метод “отпечатка пальца” – сравнение экспериментальных данных с XANES-спектрами Zn-комплексов в белках с известным лигандным окружением. Используя результаты измерений для мононуклеарных тетраэдрических Zn-комплексов [14–16], можно сделать следующие заключения: положение и форма двух наиболее интенсивных пиков (обозначены как А и В) в спектре, полученном в настоящем эксперименте, весьма схожи со спектрами в случае, когда ионы цинка координированы четырьмя цистеиновыми лигандами [15] или одним цистеином, двумя гистидинами и одним остатком аспаргат-глутамата [16]. Возникновение четко выраженной особенности (обозначена как С) можно объяснить наличием остатка гистидина в локальном окружении ионов цинка. На основе приведенного выше качественного анализа можно предположить, что каждый ион цинка, связанный с гемоглобином в присутствии 0.2 М мочевины, координирован четырьмя лигандами, двумя из которых являются цистеин и гистидин. Отметим, что приведенные соображения основаны на качественном рассмотрении полученных экспериментальных данных, для более подробной информации о предлагаемой модели требуется теоретическое моделирование.

Пленки на основе гемоглобина, обработанного раствором соли $ZnCl_2$. К раствору гемоглобина добавляли раствор $ZnCl_2$ до конечной концентрации 3×10^{-7} М. Смесь инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Раствор помещали в лентгмюровскую ванну, после формирования белковой пленки записывали XANES-спектры за К-краем поглощения цинка. В качестве контрольных были выполнены измерения XANES-спектров раствора $ZnCl_2$. Раствор соли концентрацией 10^{-3} М заливали в лентгмюровскую ванну, XANES-спектры записывали вблизи критического угла ПВО при $\theta \geq \theta_C$ в течение 24 ч. Сравнение XANES-спектров раствора белка, содержащего $ZnCl_2$ (рис. 2а), и раствора $ZnCl_2$ (рис. 2б) указывает на различный характер локального окружения цинка в этих случаях. В то же время хорошо видно, что спектр на рис. 2а практически идентичен спектру на рис. 1б.

Суммируя представленные в разделе результаты, можно сделать следующие выводы: известно, что в белках наиболее предпочтительными для связывания цинка являются остатки цистеина, константа связывания у которых на 4–5 порядков выше, чем у атома азота имидазола гистидина. Поэтому можно предположить, что связывание цинка происходит при обязательном участии цистеинов гемоглобина. В молекуле гемоглобина содержатся шесть остатков цистеина: по два в каждой β -цепи (Cys-93 и Cys-112) и по одному в каждой α -цепи (Cys-104). В интактном гемоглобине всего два реакционноспособных цистеина (Cys-93 β), остальные “скрыты” в области субъединичных контактов. Реакционная способность цистеинов зависит от их доступности и состояния окисления.

Полученные данные свидетельствуют о том, что существенное увеличение способности белка связывать ионы металлов является результатом совместного действия двух факторов: повреждающих агентов и окислительного стресса. Оба фактора способствуют повышению доступности “скрытых” SH-групп и их активации. Демаскировка SH-групп происходит вследствие перехода белка из нативного состояния в состояние, подобное расплавленной глобуле [17, 18]. Активация SH-групп может происходить под действием активных форм кислорода ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , H_2O_2), образующихся в процессе эксперимента, в том числе в результате радиолиза воды, вызванного СИ.

Известно, что скорость окисления цистеина в составе белков на несколько порядков превышает скорость окисления других аминокислот. При умеренном окислительном стрессе окисление цистеина происходит через образование интермедиатов окисления: тиолят-аниона (Cys-S⁻) и

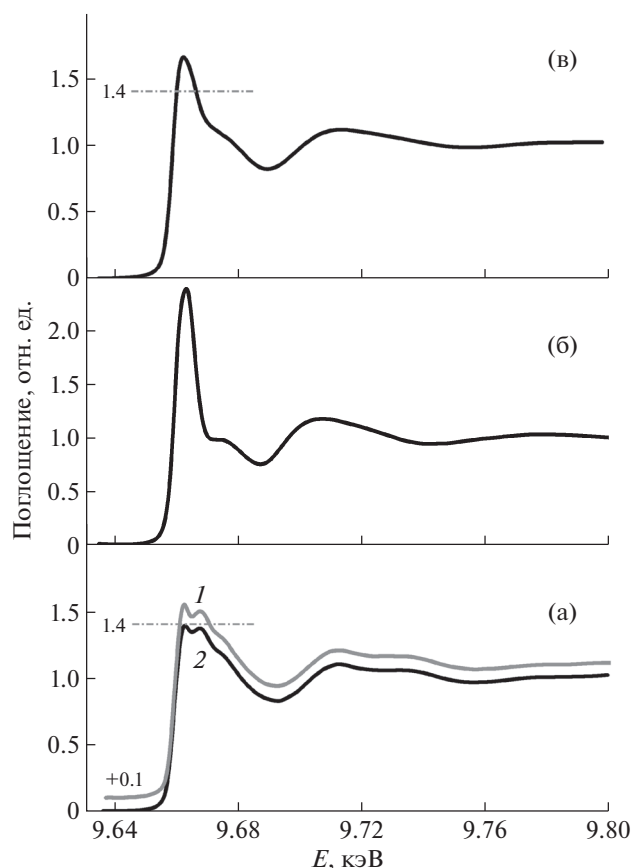


Рис. 2. Экспериментальные XANES-спектры за *K*-краем поглощения цинка: а – пленки на основе гемоглобина, обработанного раствором соли $ZnCl_2$ (1), и пленки гемоглобина, сформированной в ленгмюровской ванне на поверхности водной субфазы, содержащей мочевины (2); б – раствора $ZnCl_2$; в – пленки на основе щелочной фосфатазы.

сульфеновой кислоты (Cys-SOH) [19]. Высокореакционный Cys-SOH в белке может стабилизироваться за счет реакции с близко расположенной амидной группой с образованием сульфенамида [20] или с гистидином с образованием соединения гипервалентной серы [21]. Вполне вероятно, что в связывании металлов принимают участие интермедиаты окисления Cys-SH: тиолят-анион, сульфеновая кислота и соединение гипервалентной серы. Известно, что тиолят-анион обладает высокой металлсвязывающей способностью, примерно в 20 раз превышающей протонированную форму (Cys-SH) [22]. Цистеинсульфеновая кислота также может связывать металлы с образованием металл-сульфенатных центров [23, 24].

Пленки на основе щелочной фосфатазы. Для сравнения были проведены дополнительные исследования белковой пленки на основе щелочной фосфатазы – металлофермента, содержащего ионы цинка. Щелочные фосфатазы представляют собой димерные ферменты, в активном центре

которых присутствуют двухвалентные катионы магния и цинка, ответственные за связывание субстрата [25]. Известно, что катионы цинка принимают непосредственное участие в каталитическом акте [26].

XANES-спектры за *K*-краем поглощения цинка для пленки щелочной фосфатазы представлены на рис. 2в. Сопоставление спектров XANES различных белковых пленок – на основе гемоглобина и щелочной фосфатазы – позволяет утверждать, что спектры чувствительны к изменениям локальной структуры цинка в белках при регистрации в геометрии ПВО на поверхности жидкой субфазы. Это выражается, во-первых, в изменении формы спектров, во-вторых, в изменении интенсивности “белой линии”, которая, как было отмечено при исследовании гемоглобина, является индикатором КЧ ионов цинка в белках. В случае щелочной фосфатазы интенсивность белой линии достигает значения 1.6, что соответствует КЧ = 5 и 6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены XANES-спектры белковых пленок (гемоглобина и щелочной фосфатазы), сформированных на поверхности жидкости. Измерения с помощью метода рентгеновской спектроскопии поглощения во флуоресцентной моде в геометрии ПВО проводили на станции “Ленгмюр” (Курчатовский комплекс синхротронно-нейтронных исследований).

Экспериментально обнаружено существенное усиление способности гемоглобина связывать ионы металлов (цинка и железа) в присутствии слабого раствора мочевины (0.09 М). Выявлена важная роль окислительных процессов в ускорении связывания металлов молекулами белка. Полученные данные свидетельствуют о том, что существенное увеличение способности белка связывать ионы металлов является результатом совместного действия двух факторов: повреждающих факторов (мочевины) и окислительного стресса. Под действием повреждающих факторов может происходить лабилизация конформации белка с демаскировкой “скрытых” цистеинов, а в результате окислительных процессов образуются интермедиаты окисления белковых тиолов, которые являются предпочтительными лигандами для формирования комплексов с цинком.

Проведенные экспериментальные исследования наглядно демонстрируют новые возможности рентгеновской абсорбционной спектроскопии для изучения белковых макромолекул: показана высокая чувствительность XANES-спектров к изменениям локальной структуры белков при регистрации во флуоресцентной моде в условиях ПВО. Дополнительные преимущества таких из-

мерений связаны с возможностью проводить исследования *in situ* процессов, протекающих в белковых молекулах, в условиях, моделирующих различные патологические воздействия на клетку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bianconi A.* // X-Ray Absorption: Principles, Applications and Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES. N.Y.: John Wiley & Sons, 1988. 573 p.
2. *Bokhoven J.A., Lamberti C.* X-Ray Absorption and X-Ray Emission Spectroscopy. Theory and Applications. N.Y.: John Wiley & Sons, 2016. 890 p.
3. *Michael W.M., Ryan G.H., Marco E.R. et al.* // Science. 2017. V. 356. P. 1276.
4. *Boffi F., Ascone I., Della-Longa S. et al.* // Eur. Biophys. J. 2003. V. 32. P. 329.
5. *Reeg S., Grune T.* // Antioxid Redox Signal. 2015. V. 23. P. 239.
6. *Leal S.S., Cristóvão J.S., Biesemeier A. et al.* // Metallomics. 2015. V. 7. P. 333.
7. *Verbrugge F.H., Tang W.H.W., Hazen S.L.* // Kidney Int. 2015. V. 88. № 3. P. 474.
8. *Pieniazek A., Gwozdziński K.* // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015. I. 783073.
9. *Lima F.A., Penfold T.J., Veen R.M. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2014. V. 16. P. 1617.
10. *Wilson S.A., Green E., Mathews I.I. et al.* // PNAS. 2013. V. 110. № 41. P. 16333.
11. *Hocking R.K., Wasinger E.C., Yan Y.-L. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2007. № 129. P. 113.
12. Interpreting XANES. Illinois Institute of Technology Bunker G. // http://gbxafs.iit.edu/training/XANES_intro.pdf. Дата доступа 28 августа 2017.
13. *Paola D.A., Maurizio B.* // J. Phys. Chem. A. 2004. V. 108. P. 4505.
14. *Feiters M.C., Eijkelenboom A.P.A.M., Nolting H.-F. et al.* // J. Synchr. Rad. 2004. № 10. P. 86.
15. *Giachini L., Veronesi G., Francia F. et al.* // J. Synchr. Rad. 2010. V. 17. P. 41.
16. *Veronesi G., Whitehead S.J., Francia F. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1797. P. 494.
17. *Jennings P.A., Wright P.E.* // Science. 1993. V. 262. P. 892.
18. *Culbertson D.S., Olson J.S.* // Protein Folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology, Disease. London: Taylor and Francis, 2010. P. 97.
19. *Jia P.W., Buehler R.A., Boykins R.M. et al.* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 4894.
20. *Salmeen A., Andersen J.N., Myers M.P. et al.* // Nature. 2003. V. 423. P. 769.
21. *Nakamura T., Yamamoto T., Abe M. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 6238.
22. *Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I. et al.* // Chem. Biol. 2003. V. 10. P. 677.
23. *Arakawa T., Kawano Y., Katayama Y. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 14838.
24. *Sieracki N.A., Tian S., Hadt R.G. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 924.
25. *Poltorak O.M., Chukhray E.S., Torshin I.Y. et al.* // J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic. 1999. V. 7. P. 165.
26. *Wang J., Steiglitz K.A., Kantrowitz E.R.* // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 8378.