

УДК 535-34, 535-14, 573.6

**ТЕРАГЕРЦОВЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ 2,3-БИФОСФОГЛИЦЕРАТА
В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ И ИХ ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ****Л.И. Камышева, Я.В. Грачев, Л.Б. Киселева, Н.С. Вашурин,
О.А. Лопатиев, И.П. Зелди, И.И. Попов, В.Г. Беспалов**

Работа посвящена исследованию диагностики 2,3-бифосфоглицерата – важного фосфорорганического соединения в эритроцитах крови млекопитающих. Представлены экспериментально полученные спектры пропускания крови с добавлением рибоксина, являющимся ингибитором мутазы 2,3-бифосфоглицерата, в диапазоне 0,1–1 ТГц.

Ключевые слова: терагерцовое излучение, спектр пропускания, кровь, эритроциты, гемоглобин, 2,3-бифосфоглицерат.

Введение

Среди фосфорорганических соединений в эритроцитах крови млекопитающих 2,3-бифосфоглицерат (2,3-БФГ) занимает особое место, так как регулирует сродство гемоглобина к кислороду. Соединение в 26 раз снижает прочность связывания кислорода, что делает возможным его диффузию из эритроцитов и поступление в клетки-потребители организма, в том числе и в нейроны головного мозга.

Первые эксперименты по количественному определению этого соединения методом ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии были проведены еще в 70-х г.г. XX в. Было установлено, что хромофором (химической группой, максимально поглощающей ультрафиолетовое излучение спектра) служит фосфатная группа. Однако при проведении исследований этим методом возник целый ряд проблем. Во-первых, кроме 2,3-БФГ в эритроцитах и плазме крови содержатся такие фосфорилированные углеводы, как группа фосфогексоз, 2-фосфоглицерат, 3-фосфоглицерат, фосфоэнолпируват и др. Более того, доля этих соединений в общем фосфоуглеводном пуле намного выше, чем доля 2,3-БФГ, количество которого изменяется от нуля до максимума в каждом полном обороте кровотока. В отличие, например, от глюкозы и других шестиуглеродных сахаров, которые поступают в эритроциты крови извне и там подвергаются ферментативному фосфорилированию, 2,3-БФГ является продуктом влияния фермента БФГ-фосфомутазы. В ходе этой реакции фосфогруппа в 1,3-бифосфоглицерате переносится с C_1 на C_2 . Срок жизни образовавшегося из 1,3-бифосфоглицерата 2,3-БФГ измеряется долями секунд. Указанная реакция в эритроцитах имеет место только тогда, когда эти клетки находятся в артериальном отделе капиллярной сети органа. Во всех других кровеносных сосудах образование 2,3-БФГ отсутствует. Более того, после поступления эритроцитов из артериальной капиллярной сети в венозную начинается ферментативный распад этого соединения до 3-фосфоглицерата и частичная его диффузия в плазму крови [1, 2].

В связи с наличием одного и того же хромофора (фосфатная группа) во всех семи фосфоуглеводах гликолитического цикла использование метода УФ спектроскопии предполагает предварительное разделение этих соединений или выделение из них 2,3-БФГ. Поскольку это соединение, в отличие от остальных шести, является крайне нестабильным и короткоживущим, необходимо принятие специальных мер его внутриклеточной стабилизации, т.е. защита от воздействия бифосфоглицерат-фосфатазы (БФГ-фосфатазы), которая катализирует его распад.

Разделение фосфоуглеводов, выделенных из эритроцитов, тем более – выделение даже стабилизированного 2,3-БФГ, кроме огромной технической сложности, дороговизны и длительности, всегда сопровождается значительными потерями искомого соединения.

Процесс образования и распада 2,3-БФГ [3] представлен на рис. 1. В связи с этим авторы сочли целесообразным провести предварительное измерение содержания суммы фосфоуглеводов в эритроцитах и плазме венозной крови человека (донора), включая 2,3-БФГ, в терагерцовом (ТГц) диапазоне электромагнитного излучения.

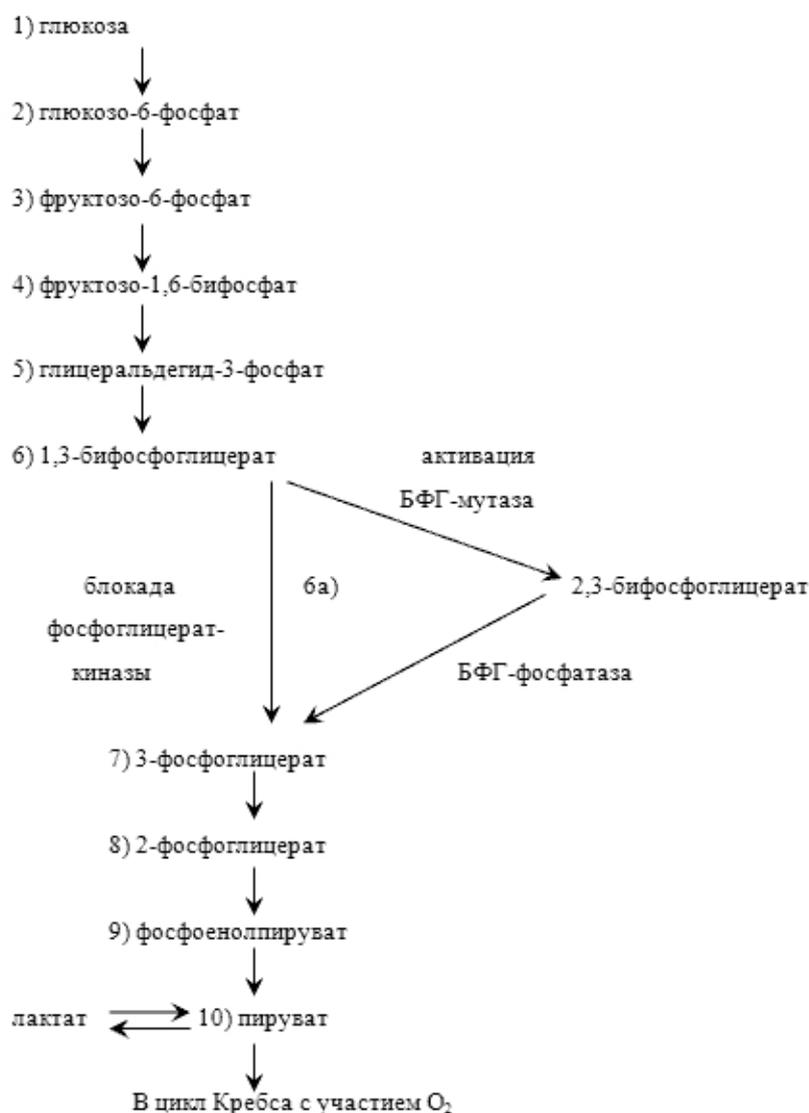


Рис. 1. Схема синтеза и распада 2,3-бисфосфоглицерата в эритроцитах

Исследования проводились с помощью метода ТГц спектроскопии с разрешением во времени, подробно описанного в работах [4, 5]. Описание спектрографа можно найти в работах [6–8]. В таблице приведены параметры ТГц спектрографа.

Средняя мощность ТГц излучения, мкВт	48 ± 4
Длительность импульса, пс	3
Частота повторения импульсов, МГц	75
Спектральный диапазон, ТГц	0,02–1,5
Отношение сигнал/шум в спектре	100
Погрешность определения пропускания, %	2,5

Таблица. Параметры ТГц спектрографа

Методика приготовления проб

За основу авторами была взята гипотеза, что среди фосфоуглеводов (фосфоглюкоза и фосфофруктоза) и шести фосфорилированных 3-х углеродных фрагментов их распада в эритроцитах находится и 2,3-бисфосфоглицерат. В связи с тем, что цитоплазма этих клеток на 80% состоит из воды, поглощающей ТГц излучение, а искомое нами соединение крайне нестабильно, был принят ряд мер, включающих высушивание образцов и стабилизацию 2,3-БФГ.

Исследованию подлежали следующие пробы:

- влажная эритроцитарная масса;
- сухая эритроцитарная масса;

- влажная эритроцитарная масса, содержащая рибоксин;
- сухая эритроцитарная масса, содержащая рибоксин;
- цельная плазма крови, содержащая рибоксин;
- высушенная плазма крови, содержащая рибоксин;
- цельная плазма крови без рибоксина;
- высушенная плазма крови без рибоксина.

В исследовании использована донорская кровь человека. За один час до забора крови донору внутривенно вводили 2 мл фармакопейного препарата – рибоксина, продукты биотрансформации которого являются ингибиторами БФГ-мутазы, тем самым предотвращается преждевременный распад 2,3-БФГ и его стабилизация.

Отделение эритроцитов от плазмы крови проводили стандартными методами клинической биохимии, а высушивание эритроцитарной массы и плазмы – методом лиофильной сушки.

Результаты исследования

Согласно полученным данным, поглощение ТГц излучения нативными образцами эритроцитов, их гемолизатов и плазмы крови с применением и без применения рибоксина в диапазоне 0,1–1 ТГц колеблется в широких пределах.

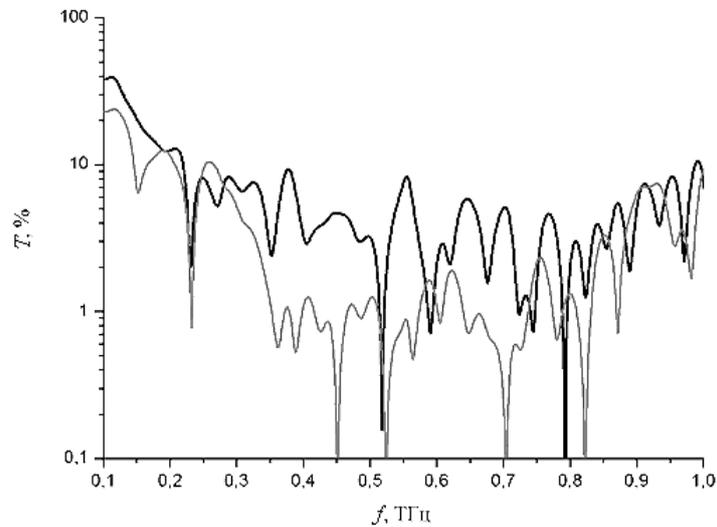


Рис. 2. ТГц спектры пропускания эритроцитарной массы с рибоксином (серый) и контрольной эритроцитарной массы с физраствором (черный)

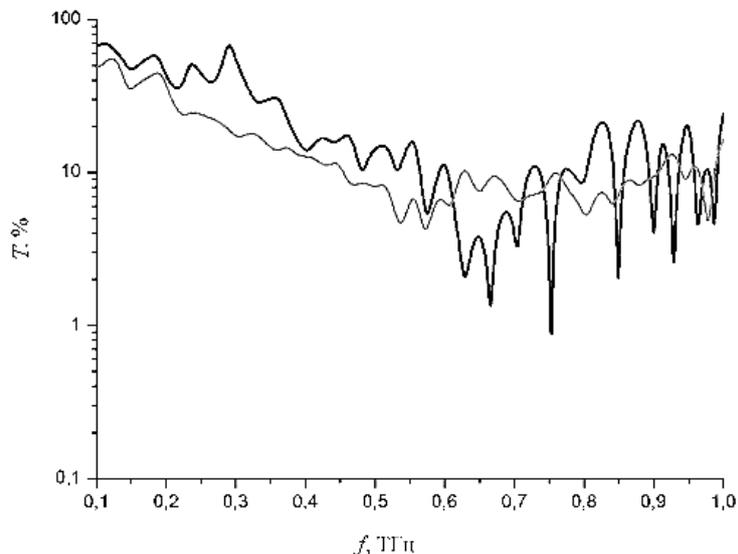


Рис. 3. ТГц спектры пропускания высушенной эритроцитарной массы с рибоксином (серый)

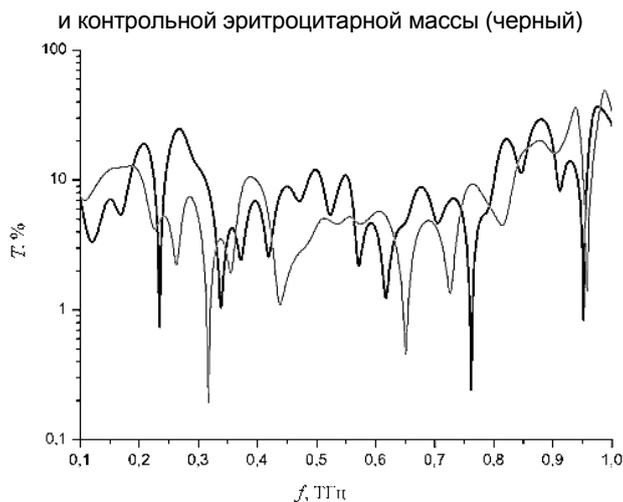


Рис. 4. ТГц спектры пропускания гемолизата с рибоксином (серый) и гемолизата с физраствором (черный)

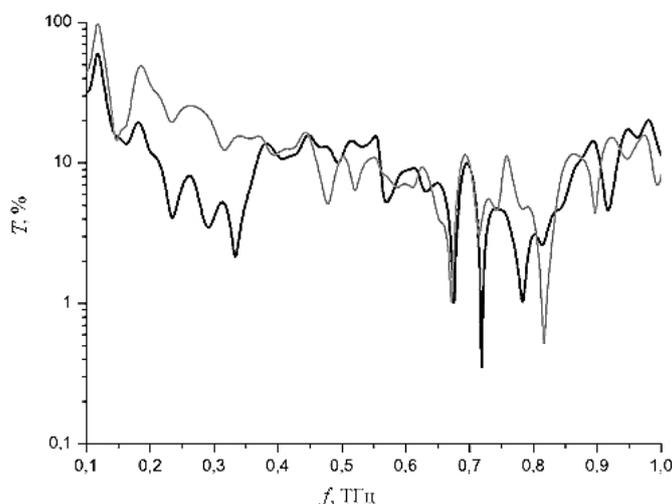


Рис. 5. ТГц спектры пропускания плазмы с рибоксином (серый) и контрольной плазмы с физраствором (черный)

Так, максимум пиков поглощения образца с нативными эритроцитами приходится на следующие частоты: 0,23; 0,52; 0,59 и 0,79 ТГц, гемолизатом эритроцитов – на 0,24; 0,55 и 0,79 ТГц, а плазмой – на 0,33; 0,67; 0,72 и 0,78 ТГц (рис. 2–5). На рисунках по оси абсцисс отложена частота излучения в ТГц, по оси ординат – пропускание образца в процентах. Данные позволяют предположить, что, во-первых, высокая степень поглощения ТГц излучения влажными (нативными) образцами связано с наличием в них воды, особенно связанной. Во-вторых, наличие большого количества пиков поглощения может свидетельствовать о присутствии в образцах нескольких видов фосфоуглеводов, а не одного 2,3-БФГ.

Применение рибоксина для стабилизации 2,3-БФГ оказывает принципиальное влияние на частотную характеристику поглощения ТГц спектра излучения. Так, под действием препарата происходит увеличение числа и величины пиков поглощения (рис. 2). В плазме и гемолизате процесс выражен в меньшей степени, чем в эритроцитах (рис. 4, 5). Лиофильная сушка всех образцов приводит к резкому снижению степени поглощения (рис. 3) излучения образцом.

Заключение

Проведенные исследования позволяют считать, что для обеспечения корректности результатов необходимо полное удаление из образцов воды, включая химически связанную, что может быть достигнуто путем кристаллизации биомолекул. Необходим дальнейший поиск фармакологических препаратов, ингибирующих активность фермента бифосфоглицерат-фосфатазы и стабилизацию 2,3-бифосфоглицерата во всех трех средах. Наличие множества пиков поглощения, указывающих на наличие в исследуемых образцах целой группы фосфоуглеводов, а не только одного 2,3-бифосфоглицерата, подчеркивает необходимость предварительного определения каждого из семи фосфоуглеводных соединений гликолиза отдельно для идентификации линий поглощения каждого из этих соединений, включая 2,3-бифосфоглицерат.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (ГК №14.740.12.0841, ГК №16.513.11.3070).

Литература

1. Benesch R.E., Benesch R. The Mechanism of Interaction of Red Cell Organic Phosphates with Hemoglobin // Adv. Protein Chem. – 1974. – № 28. – P. 211–217.
2. Rose Z.B. Enzymes controlling 2, 3-diphosphoglycerate in human erythrocytes // Fed. Proc. – 1970. – № 23. – P. 1105–1111.
3. Страйер Л. Биохимия: В 3-х томах. – М.: Мир, 1985. – Т. 2. – 312 с.
4. Wu Q., Zhang X.-C. Free-space electro-optic sampling of terahertz beams // Appl. Phys. Lett. – 1995. – V. 67. – P. 3523–3525.
5. Yun-Shik Lee. Principles of terahertz science and technology // Springer Science+Business Media, LLC. – 2009. – XII. – 340 p.
6. Беспалов В.Г., Городецкий А.А., Денисюк И.Ю., Козлов С.А., Крылов В.Н., Лукомский Г.В., Петров Н.В., Путилин С.Э. Методы генерации сверхширокополосных терагерцовых импульсов фемтосекундными лазерами // Оптический журнал. – 2008. – Т. 75. – № 10. – С. 34–41.
7. Беспалов В.Г., Крылов В.Н., Путилин С.Э., Стаселько Д.И. Генерация излучения в дальнем ИК-диапазоне спектра при фемтосекундном оптическом возбуждении полупроводника InAs в магнитном поле // Оптика и спектроскопия. – 2002. – Т. 93. – № 1. – С. 158–162.
8. Bepalov V.G., Gorodetsky A.A., Grachev Y.V., Kozlov S.A., Smolyanskaya O.A. Influence of THz broadband pulse radiation on some biotissues // Proc. of SPIE. – 2009. – V. 7547. – P. 754707.

- Камышева Людмила Ивановна** – Министерство образования и науки Республики Марий Эл, ведущий специалист, kamilaiva@mail.ru
- Грачев Ярослав Владимирович** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, аспирант, grachev_y@mail.ru
- Киселева Людмила Борисовна** – Марийский государственный университет, кандидат биологических наук, доцент, zeldiwe@gmail.com
- Вашиурин Никита Сергеевич** – Марийский государственный университет, студент, Nickita_Vashurin@mail.ru
- Лопатиев Олег Анатольевич** – В/ч 31265, командир, porov@marsu.ru
- Зелди Иван Петрович** – Марийский государственный университет, кандидат биологических наук, доцент, zeldiwe@gmail.com
- Попов Иван Иванович** – Марийский государственный университет, доктор физ.-мат. наук, профессор, заведующий кафедрой, porov@marsu.ru
- Беспалов Виктор Георгиевич** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, доктор физ.-мат. наук, профессор, victorbespaloff@gmail.com