

УДК 616.8-092

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛ ДНК И БЕЛКА В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

© 2024 г. А. В. Трофимов<sup>1</sup>, Т. И. Власова<sup>1, \*</sup>, В. А. Трофимов<sup>1</sup>,  
Д. И. Сидоров<sup>1</sup>, М. А. Спирина<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН И.В. Решетовым

Поступило 25.05.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

В исследовании оценивались конформационные изменения биомолекул ДНК и белка при ишемическом инсульте (ИИ) разной степени тяжести методом РАМАН-спектроскопии. У больных с ИИ изменяется конформационная структура гемопорфирина и, как следствие, увеличивается отношение  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$  (сродство гемоглобина к лигандам) и регистрируется увеличение  $I_{1375}/I_{1172}$  (изменение конформации пирролов). Также наблюдаются изменения в спектрах геномных ДНК при частотах, обусловленных валентными колебаниями первичных аминов ( $3400\text{ см}^{-1}$ ), вторичных аминов и гидроксильных, вовлеченных в водородную связь ( $3100\text{ см}^{-1}$ ),  $\text{CH}_2$ -групп сахаро-фосфатов ( $2900\text{ см}^{-1}$ ), колебаниями вибрационных связей между азотистыми основаниями и сахарами ( $1400\text{ см}^{-1}$ ). Таким образом, при ИИ наблюдаются значительные изменения в спектрах геномных ДНК и гемоглобина, которые свидетельствуют о конформационных перестройках данных молекул. При тяжелом ИИ выраженность выявленных изменений спектров ДНК и гемоглобина была максимальной.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, окислительный стресс, геномная ДНК, гемоглобин, ИК-спектроскопия

**DOI:** 10.31857/S2686738924050108

### ВВЕДЕНИЕ

Ишемический инсульт (ИИ) является одной из основных причин инвалидизации пациентов во всем мире [1]. Нарушение кровоснабжения головного мозга приводит к развитию острой гипоксии и гибели нейронов [2]. Важным патогенетическим механизмом ишемического повреждения тканей является развитие воспаления с активацией иммунной системы и генерацией медиаторов воспаления, определяющих феномен вторичной альтерации и расширения зоны повреждения тканей при инфаркте головного мозга [3, 4]. При ИИ нейровоспаление начинается в течение нескольких минут после начала ишемии и продолжается в течение нескольких дней [5]. Одними из наиболее агрессивных молекул при

гипоксическом повреждении клеток и воспалении являются свободные радикалы. Окислительный стресс также ответственен за большую часть ишемически-реперфузионного повреждения, запуская механизмы клеточной гибели в ткани головного мозга [6, 7].

Цитотоксические эффекты окислительного стресса опосредованы развивающимися мембранодеструктивными процессами, повреждениями ДНК и белковых молекул и лежат в основе органических и системных дисфункций [9, 10]. Особый интерес представляют кислородтранспортная функция эритроцитов в условиях острой ишемии головного мозга. Изменение конформации гемоглобина и снижение его кислородтранспортной функции при ИИ может рассматриваться как вероятный механизм прогрессирования повреждения ткани головного мозга.

Несмотря на известные механизмы повреждающего действия окислительного стресса, роль конформационных изменений биомолекул ДНК и белков в патогенезе ишемического инсульта и прогнозировании его течения остается не до

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»

\*e-mail: v.t.i@bk.ru

конца изученной. Внедрение новых инструментальных методов диагностики расширяет возможности изучения ультраструктурных изменений при различной патологии [11].

Таким образом, определение изменений структуры молекул ДНК и гемоглобина представляет научно-практическую значимость в аспекте расширения теоретических представлений о патогенезе ИИ и разработке новых способов прогнозирования течения патологии и развития осложнений.

Цель исследования — методами ИК-спектроскопии и РАМАН-спектроскопии изучить конформационные изменения биомолекул ДНК и белка при ИИ разной степени тяжести.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование проведено на базе ГБУЗ РМ “Мордовской республиканской центральной клинической больницы” (г. Саранск). Все пациенты с ишемическим инсультом при поступлении были обследованы согласно действующим стандартам оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения. Протокол клинического исследования составлен в соответствии с действующими этическими стандартами и одобрен локальным этическим комитетом медицинского института ФГБОУ ВО “МГУ им. Н.П. Огарева”. Объектом исследования выступила периферическая венозная кровь здоровых людей и пациентов с ишемическим инсультом, полученная в первые сутки заболевания при наличии информированного согласия.

Критерии включения пациентов в исследование: верифицированный диагноз ОНМК ишемического генеза.

Критерии исключения: возраст пациента моложе 35 и старше 70 лет; добровольный отказ от участия в исследовании; недееспособные пациенты и лица с острой психической продуктивной симптоматикой (психоз, бред, галлюцинации); продолжительность ишемического инсульта более трех суток или время начала заболевания неизвестно; наличие онкологических заболеваний, эндокринной патологии, ревматических болезней, ВИЧ-инфекции; состояние беременности и лактации; применение при сопутствующих заболеваниях цитостатиков, иммунодепрессантов и кортикостероидов.

Степень нарушений функций центральной нервной системы оценивались по критериям шкалы NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale — NIH Stroke Scale) с сопоставлением размера очага острой ишемии головного мозга, который регистрировался с помощью мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) [12].

Обследуемые были разделены на группы: I — контрольная, включены практически здоровые (соблюдение критериев исключения, отсутствие на момент исследования острых и хронических заболеваний в стадии декомпенсации, отсутствие факторов риска по ишемическому инсульту) пациенты ( $n = 20$ ; средний возраст  $46.7 \pm 5.3$ , 10 мужчин, 10 женщин); II — пациенты с легкой степенью нарушений функций центральной нервной системы по шкале NIHSS от 1 до 4 баллов ( $n = 20$ ; средний возраст  $59.1 \pm 8.2$ , 11 мужчин, 9 женщин); III — пациенты со среднетяжелой степенью нарушений функций центральной нервной системы, очаговый неврологический дефицит соответствует по шкале NIHSS 5 — 14 баллам ( $n = 20$ ; средний возраст  $55.2 \pm 7.3$ , 14 мужчин, 6 женщин); IV — пациенты с тяжелой степенью нарушений функций центральной нервной системы, неврологический дефицит составил по шкале NIHSS 15—20 баллов ( $n = 20$ ; средний возраст  $58.1 \pm 9.4$ , 12 мужчин, 8 женщин).

ДНК выделяли из моноклеаров периферической крови по стандартной методике Boodram L.L. Для анализа конформационных изменений гемоглобина использовали мазки периферической крови.

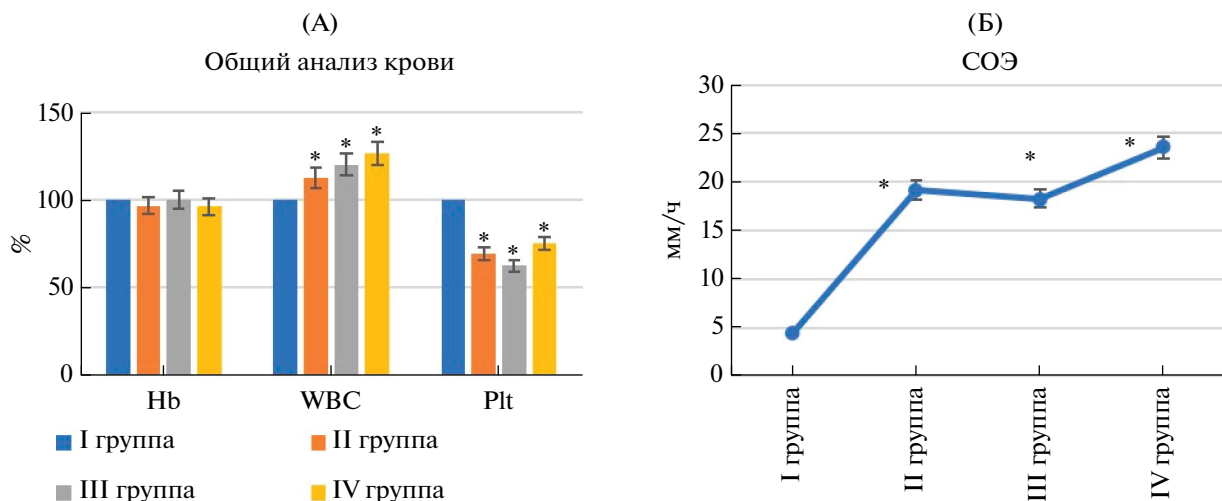
Фурье спектры препаратов ДНК регистрировали на спектрометре IRPrestige-21 SHIMADZU (Япония) в диапазоне  $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$  (изменение интенсивности поглощения характерных полос рассчитывали по отношению к поглощению при частоте  $4000\text{ см}^{-1}$ ). Спектры комбинационного рассеивания (КР) гемоглобина исследовали на спектрометре *in via Basis* (Renishaw, Великобритания) в диапазоне  $1355\text{--}1588\text{ см}^{-1}$  с последующим расчетом отношений интенсивностей для определения особенностей конформации гемоглобина.

Данные статистически обрабатывали. Проверка соответствия выборки закону нормального распределения проводилась с помощью критерия Шапиро—Уилка. В последующем для сравнения групп использовали непараметрический критерий U Мана—Уитни. Корреляционный анализ также выполняли с использованием непараметрического критерия Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общий анализ крови при ИИ показал увеличение выраженности лейкоцитарной реакции и скорости оседания эритроцитов при увеличении тяжести состояния, также регистрировали снижение тромбоцитов относительно контроля при нарушении кровоснабжения головного мозга (рис. 1).

Показатели свертывающей способности крови (АЧТВ, ПТИ, МНО, фибриноген) у больных с различной тяжестью ишемического инсульта



**Рис. 1.** Характеристика групп пациентов с ишемическим инсультом: общий анализ крови.

Примечание: Hb – гемоглобин, WBC – лейкоциты, Plt – тромбоциты, СОЭ – скорость оседания эритроцитов; \* – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при  $p < 0.05$ .

отличались от показателей контроля, но при обсуждении результатов исследований следует учитывать прием больными препаратов с антикоагулянтным действием.

Оценка липидного профиля показала, что обследуемые с ИИ имеют повышенный уровень холестерина в венозной крови. У больных с легкой степенью тяжести ИИ содержание холестерина превышало показатели контроля в среднем на 51.8%. У пациентов со средней степенью тяжести ИИ содержание холестерина превышало показатели контроля на 62.4%, а при тяжелой форме заболевания содержание холестерина было выше показателей контроля на 97.3% ( $p < 0.05$ ). У обследуемых с ИИ повышено содержание ЛПНП на 16.3% при легкой форме заболевания, на 63.7% при средней тяжести заболевания, при тяжелой форме в среднем на 85.3% относительно контроля. Содержание ЛПВП у больных с легким ИИ превышало показатели контроля на 53.0%, при средней степени тяжести также на 66.0% и у больных ИИ в тяжелой форме на 16.7%. Содержание ТГ в крови больных ишемическим инсультом было также повышено. Изменения в липидном спектре плазмы крови у больных ИИ указывает на дисбаланс в липидном обмене со смещением величины атерогенности с 2 в норме до 4.07 при тяжелой форме заболевания.

При различных заболеваниях, в том числе при ИИ, сопровождающихся развитием окислительного стресса, возникают реальные предпосылки для окислительных повреждений, имеющих далеко идущие функциональные нарушения, важнейших биополимеров – ДНК, выполняющих

информационную функцию, и молекул белков, обеспечивающих выполнение множества клеточных функций. При оценке содержания перекисей в плазме крови больных ИИ различной степени тяжести было выявлено повышение данного показателя при увеличении тяжести состояния (рис. 2).

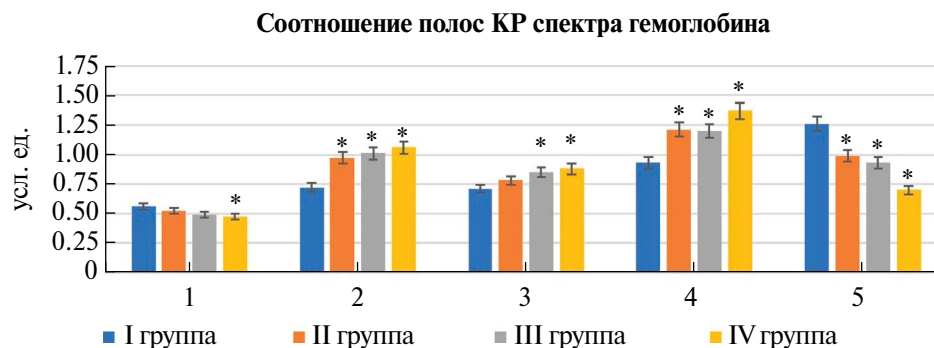
Поскольку окислительный стресс является важнейшим патогенетическим звеном неврологических заболеваний, отличающимся глубиной и распространенностью в зависимости от природы заболевания, то безусловный интерес вызывает исследование повреждений и модификаций геномных ДНК и белков как фактора прогрессирования и утяжеления заболевания.

Для оценки кислородтранспортной функции эритроцитов применялся метод РАМАН-спектроскопии. Анализ спектров КР гемоглобина эритроцитов показал, что у больных с ишемическим инсультом изменяется конформационная



**Рис. 2.** Количество перекисей в плазме крови пациентов с ишемическим инсультом.

Примечание: \* – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при  $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Динамика изменение величин показателей, характеризующих кислородсвязывающую способность гемоглобина эритроцитов больных с ишемическим инсультом.

Примечание: 1 –  $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$  – содержание окси-Нб; 2 –  $I_{1355}/I_{1550}$  – способность Нб в пробе связывать лиганды; 3 –  $I_{1375}/I_{1580}$  – способность Нб выделять лиганды; 4 –  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$  – сродство Нб к лигандам; 5 –  $I_{1375}/I_{1172}$  – изменение конформации пирролов; \* – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при  $p < 0.05$ .

структура гемопорфирина и, как следствие, угнетается кислородсвязывающая способность гемоглобина, максимально при тяжелой форме заболевания (рис. 3).

Вполне вероятно, что выявленный эффект формирования устойчивого оксигемоглобинового комплекса, является одной из причин нарушения кислородтранспортной функции эритроцитов при ИИ и может быть связан с образованием межбелковых сшивок, вызванных свободными радикалами, образующимися при окислительном стрессе, важнейшем патогенетическом компонентом ишемического инсульта [13].

Величина показателя  $I_{1375}/I_{1172}$ , характеризующая колебательную активность пиррольных колец, у больных с ишемическим инсультом уменьшается, что свидетельствует о конформационных изменениях пирролов, в результате чего эритроциты способны связывать кислород более эффективно, чем отдавать его [14].

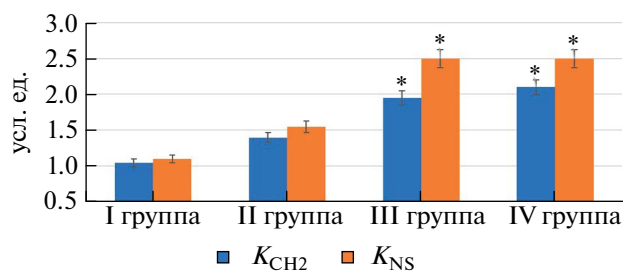
Структурные изменения в ДНК изучали с помощью высокоинформативного метода ИК-спектроскопии – мощного инструмента диагностики структурных изменений в таких сложных молекулах как белки и нуклеиновые кислоты, а именно образование и разрыв водородных и других связей, изменения конформации и конфигурации. По изменению таких параметров как полоса и интенсивность поглощения, при разных частотах, их соотношения, можно судить не только о структурных изменениях, связанных с различными патологическими процессами, но и диагностировать уровень тяжести различных заболеваний [15].

Известно, что в стабилизации вторичной структуры ДНК важнейшую роль играют водородные связи между комплементарными парами азотистых оснований и гидрофобные взаимодействия между ними, направленные вдоль оси двойной спирали,

так называемые стэкинг-взаимодействия, усиливающие водородные связи между основаниями и способствуя уплотнению спирали. Ароматические кольца азотистых оснований в ДНК расположены перпендикулярно оси спирали молекулы биополимера, что обуславливает параллельность их поверхностей и перекрыванию р-орбиталей. Стабильность и характер такого рода взаимодействий зависят от связей между азотистыми основаниями и дезоксирибозой.

Описанные выше особенности структурной организации ДНК приводят к тому, что молекулы воды связываются в основном с полярными фосфатными группами, расположенными на поверхности сахарофосфатного остова молекулы ДНК.

Ослабление энергии стэкинг-взаимодействий приводит к проникновению молекул воды внутрь двойной спирали и нарушению водородных связей,



**Рис. 4.** Изменения величины показателей  $K_{CH_2}$  ( $2500\text{ см}^{-1}/4000\text{ см}^{-1}$ ), характеризующего интенсивность поглощения  $-CH_2$  групп сахарофосфатов, и  $K_{NS}$  ( $1400\text{ см}^{-1}/4000\text{ см}^{-1}$ ), обусловленных колебаниями вибрационных связей между азотистыми основаниями и сахарами в зависимости от степени выраженности нарушений функций ЦНС при ишемическом инсульте. Примечание: \* – достоверные отличия от данных контрольной (I) группы при  $p < 0.05$ .

дестабилизации двойной спирали и расхождению цепей ДНК. При чем процесс плавления цепей ДНК обратим и после окончания воздействия цепи ДНК, благодаря спариванию оснований, вновь образуют двойную спираль в участке их расхождения. Спектроскопия препаратов ДНК, полученных из крови больных с ишемическим инсультом различной степени тяжести, позволила выявить изменения в структуре сахарофосфатного остова молекулы, связанные со снижением стабильности связей дезоксирибоза-азотистое основание.

Полученные данные свидетельствуют о смещении взаимной ориентации фосфатных групп ДНК вследствие локального плавления и раскручивания двойной спирали, взаимообусловленных ослаблением водородных связей между азотистыми основаниями и стэкинг-взаимодействий, образованием изгибов и конформационной структуры ДНК в целом.

Дестабилизация двойной спирали облегчает расхождение цепей ДНК. Наиболее выражено описанные выше молекулярные перестройки, приводящие к изменению структуры ДНК, проявляются у больных с тяжелыми формами ИИ (рис. 4).

Полученные с помощью ИК-спектроскопии препаратов ДНК из крови больных ИИ данные об особенностях конформационной структуры свидетельствуют о возможных изменениях активности генетических процессов, включая экспрессивную активность генов, что нуждается в дальнейшем изучении.

Корреляционный анализ показал, что выраженность молекулярных изменений (ДНК и гемоглобин) была сопряжена с тяжестью состояния и выраженностью неврологического дефицита по шкале NIHSS ( $r = 0.537-0.901$ ,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, у больных ИИ наблюдаются значительные изменения в ИК-спектрах геномных ДНК и гемоглобина, которые свидетельствует о конформационных перестройках данных молекул, как молекулярной основы изменения функциональной активности клеток при ИИ. Характер и интенсивность этих изменений зависят от тяжести заболевания, что определяет возможность использования их как биомаркеров ишемического инсульта.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, а также были одобрены Локальным этическим комитетом Мордовского государственного университета (г. Саранск), протокол № 114 от 28 февраля 2023 года. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Campbell B.C.V., Khatri P. Stroke. *Lancet*. 2020, vol. 396, no. 10244, pp.129–142. .
2. Semin D.A., Orlova V.M., Snegireva T.G. Quality of life and mental health of patients after a traumatic brain injury. *Head and Neck. Russian Journal*. 2022, vol. 10, no. S2S2, pp. 120–122.
3. Zhu H., Hu S., Li Y.Ю et al. Interleukins and Ischemic Stroke. *Front Immunol*. 2022 no. 13, pp. 828447.
4. Кастыро И.В., Костяева М.Г., Королев А.Г., и др. Влияние моделирования септопластики и хирургического повреждения верхней челюсти на изменения норадренергической системы гиппокампальной формации. *Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratoriae*. 2023, Т. 29, № 2, С. 24–35.
5. Alsbrook D.L., Di Napoli M., Bhatia K., et al. Neuroinflammation in Acute Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2023, vol. 23, no. 8, pp. 407–431.
6. Orellana-Urzúa S., Rojas I., Libano L., et al. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*. 2020, vol. 26, no. 34, pp. 4246–4260.
7. Кастыро И.В., Хамидулин Г.В., Дьяченко Ю.Е., и др. Исследование экспрессии белка p53 и образования темных нейронов в гиппокампе у крыс при моделировании септопластики. *Российская ринология*. 2023, Т. 31, №1, С. 27–36.
8. Матвеев Д.В., Гаврилова С.А., Кузнецов М.Р., и др. Применение липосомально-антиоксидантного комплекса в профилактике и лечении синдрома реперфузии. Экспериментальное исследование. *Head and Neck / Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации “Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи”*. 2022, vol. 10, no. 4, pp. 16–23.
9. Mnatsakanyan A., Korolev A., Inozemtsev A., et al. Modeling septoplasty and sensory deprivation in rat olfactory analyzer and its impact on the responses of the autonomic nervous system, *Archiv EuroMedica*. 2023, vol. 13, no. 1.

10. Ibragimova Zh.M., Kerimov Z.M., Shukurova P.A., et al. The study of the rate of oxygen uptake and lipid peroxidation reactions in the brain tissues and the lens of the eye of rats under the influence of electromagnetic radiation of non-thermal intensity in the pre-natal period (rattus wistar). *Head and Neck. Russian Journal*. 2022, T. 10, № S2S1, C. 28–31.
11. Саакян С.В., Складнев Д.А., Алексеева А.П., и др. Роль инструментальных методов диагностики в оценке метаболического статуса опухолей придаточного аппарата глаза. *Head and Neck / Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации “Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи”*. 2024, T. 12, № 1, C. 128–135.
12. Aoki J, Kimura K, Koga M, Kario K, et al. NIHSS-time score easily predicts outcomes in rt-PA patients: the SAMURAI rt-PA registry. *J Neurol Sci*. 2013, vol. 327, no. 1–2, pp.6–11.
13. Трофимов А.В., Карасев А.А., Власова Т.И. Изменение кислородтранспортной способности гемоглобина больных с ишемическим инсультом. Регинарное кровообращение и микроциркуляция. 2023, T. 22, №4, C. 50–55.
14. Юшков Б.Г., Зуев М.Г., Бриллиант С.А., и др. Изучение конформации гема и глобина фракционированных эритроцитов крыс с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света. *Биофизика*. 2023. T. 68, № 1, C. 33–40.
15. Трофимов В.А., Трофимов А.В., Кадималиев Д.А. Способ диагностики степени тяжести ишемического инсульта. *Патент на изобретение RU 2767929 C1*, 22.03.2022.

## CONFORMATIONAL CHANGES IN DNA AND PROTEIN BIOMOLECULES IN THE PATHOGENESIS OF ISCHEMIC STROKE

A. V. Trofimov<sup>1</sup>, T. I. Vlasova<sup>1, #</sup>, V. A. Trofimov<sup>1</sup>, D. I. Sidorov<sup>1</sup>, M. A. Spirina<sup>1</sup>

Presented by Academician of the RAS I.V. Reshetov

<sup>1</sup>*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «National Research Mordovia State University», Saransk, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: v.t.i@bk.ru*

**Abstract.** The study assessed conformational changes in DNA and protein biomolecules during ischemic stroke (IS) of varying severity using RAMAN spectroscopy. In patients with IS, the conformational structure of hemoporphyrin changes and, as a consequence, the ratio ( $I_{1355}/I_{1550}$ )/( $I_{1375}/I_{1580}$ ) (the affinity of hemoglobin for ligands) increases and an increase in  $I_{1375}/I_{1172}$  (change in the conformation of pyrroles) is recorded. Changes in the spectra of genomic DNA are also observed at frequencies caused by stretching vibrations of primary amines ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ), secondary amines and hydroxyls involved in hydrogen bonding ( $3100\text{ cm}^{-1}$ ), CH<sub>2</sub> groups of sugar phosphates ( $2900\text{ cm}^{-1}$ ), vibrations of vibrational bonds between nitrogenous bases and sugars ( $1400\text{ cm}^{-1}$ ). During IS, significant changes are observed in the spectra of genomic DNA and hemoglobin, which indicate conformational rearrangements of these molecules. In severe IS, the severity of the detected changes in the spectra of DNA and hemoglobin was maximum.

**Keywords:** ischemic stroke, oxidative stress, genomic DNA, hemoglobin, IR spectroscopy. stress, genomic DNA, hemoglobin, IR spectroscopy