

На правах рукописи



Иванов Владимир Евгеньевич

**ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА И ОПТИЧЕСКОГО
ЭЛЕКТРОМАГНИТОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

1.5.2 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Гудков Сергей Владимирович

Официальные оппоненты: **Меньщикова Елена Брониславовна**, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов

Соколов Алексей Викторович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», заведующий лабораторией биохимической генетики Отдела молекулярной генетики

Ведущая организация: Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Защита состоится: «__» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2021/1152/diss-Ivanov-1152.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в аэробных клетках в результате нормального метаболизма и под действием таких внешних факторов, как ионизирующее [Ward, 1988; Einor et al., 2016], ультрафиолетовое [Kim et al., 2015; Piskarev, 2018], КВЧ [Gapeyev et al., 2014], СВЧ излучения, ксенобиотики, тепловое воздействие [Синицына и др., 2018; Wang et al., 2013], видимое и инфракрасное излучение с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода [Ahn, Chung, 2012], ионов уранила [Gudkov et al., 2016] и др. Увеличение внутриклеточной концентрации АФК свыше уровня антиоксидантной защиты вызывает «окислительный стресс» [Sies, 1997], который сопровождается опасными для жизнедеятельности клеток процессами, такими как перекисное окисление липидов, окислительная модификация нуклеиновых кислот и белков [Баврина и др., 2018; Ланкин и др., 2018; Monich et al., 2018]. Установлено, что АФК не только повреждают биомакромолекулы, но выполняют в организме еще и сигнальную роль, связанную с нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза [Zakharova et al., 2018].

Ранее было показано, что при воздействии ионизирующей радиации на белковые растворы в присутствии кислорода образуются долгоживущие активные формы белков (ДАФБ), которые включают в себя долгоживущие радикалы и гидропероксиды белков [Yoshimura et al., 1993; Davies et al., 1995; Gebicki, 1997; Koyama et al., 1998; Miyazaki et al., 2002; Kumagai et al., 2003; Karp et al., 2010; Gracanin et al., 2011; Bruskov et al., 2012; Davies, 2016]. Установлено, что ДАФБ способны влиять на изменение окислительно-восстановительного гомеостаза, а при больших концентрациях вызывать мутации и трансформации клеток [Koyama et al., 1998; Kumagai et al., 2003]. Однако было неизвестно, могут ли неионизирующие воздействия приводить к образованию окислительных повреждений белков в виде долгоживущих активных форм.

В организме млекопитающих из всех АФК основным вторичным мессенджером является H_2O_2 [Stone, Yang, 2006; Simon et al., 2016; Sies et al., 2017]. H_2O_2 играет ключевую роль во внутри- и межклеточной сигнализации в клетках млекопитающих, в том числе влияет на клеточный рост, развитие апоптоза и некроза [Stone, Yang, 2006; Silachev et al., 2014; Smirnova et al., 2018; Vlasova et al., 2018]. Изменение содержания H_2O_2 в организме, вызванное различными физическими воздействиями, может быть важным фактором терапевтического эффекта и адаптации организма к неблагоприятным условиям окружающей среды в результате сигнально-регуляторных процессов [Forman et al., 2010; Sharapov et al., 2017]. В настоящее время в медицине широко используется ряд физиотерапевтических процедур, основанных на применении умеренной гипертермии [Mallory et al., 2016], а также источников светового воздействия [Калганова и др., 2015; Снопова и др., 2016; Губарькова и др., 2017; Forbat et al., 2017; Tsai, Hamblin, 2017; Gavrina et al., 2018; Lima et al., 2018]. Однако биологические механизмы их лечебного влияния остаются малоизученными [Gao, Chen, 2014; Alexandrovskaya et al., 2018]. Возможно, терапевтический эффект данных воздействий связан с генерацией как АФК, так

и ДАФБ. В связи с этим актуальным является исследование возможности ДАФБ к длительной генерации H_2O_2 после воздействия тепла и оптического электромагнитного излучения. Это может быть одним из механизмов активации защитных клеточных механизмов, способствующих преодолению заболеваний, обусловленных окислительным стрессом.

Цель и основные задачи исследования. Цель работы заключалась в изучении возможности образования ДАФБ под действием тепла и оптического электромагнитного излучения. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить образование ДАФБ под действием тепла и оптического электромагнитного излучения;
2. Исследовать физико-химические механизмы образования АФК в белковых растворах под действием тепла и оптического электромагнитного излучения;
3. Исследовать влияние ДАФБ, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением, на образование окислительных повреждений в ДНК *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна. Впервые методом собственной хемилюминесценции показано, что лазерное излучение с длиной волны 632,8 нм или тепловое воздействие вызывают в белковых растворах и сыворотке крови образование ДАФБ. Проведено сравнение результатов, полученных в модельных системах (растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА), бычьего гамма-глобулина (БГГ), желатина, казеина и гидролизата казеина (ГК)) и нативной сыворотке крови. Установлено, что ДАФБ, индуцированных теплом или оптическим излучением с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода, в течение длительного времени способны продуцировать АФК ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2). При этом в результате воздействия лазерного излучения или тепла происходит длительная генерация H_2O_2 . Образование ДАФБ и H_2O_2 не наблюдалось при тепловом и лазерном воздействии на растворы без кислорода или вне полосы его резонансного возбуждения с переходом в синглетное состояние. С помощью различных перехватчиков АФК установлен возможный механизм этого процесса. Методом иммуноферментного анализа показана способность сыворотки крови, подвергнутой воздействию лазерного излучения или тепла, приводить в модельной системе к образованию 8-оксогуанина (8-ОГ) – ключевого биомаркера окислительного повреждения в ДНК *in vitro*. Установлено, что введение мышам сывороток крови, подвергнутых воздействию лазерного излучения или тепла, приводит к развитию адаптивного эффекта – уменьшению количества полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ).

Научно-практическая значимость. Состоит в необходимости понимания молекулярных механизмов различных физиотерапевтических процедур, широко используемых в медицинской практике. Эти процедуры в зависимости от интенсивности и продолжительности воздействия ведут к образованию АФК, которые могут оказывать на организм человека как полезное, так и повреждающее воздействие путем возникновения окислительного стресса. Следовательно, актуальной является медико-биологическая проблема разработки норм безопасности при использовании отдельных

физиотерапевтических процедур, т.к. все эти воздействия приводят к генерации АФК аналогично ионизирующим излучениям. Результаты диссертационной работы носят фундаментальный характер в области выяснения механизмов действия электромагнитных излучений и эффективного их использования в молекулярной и клеточной медицине. Основные результаты исследования могут быть использованы в курсе лекций по биомедицине и биофизике.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Под действием исследованных неионизирующих физических факторов происходит образование ДАФБ с временами полужизни 4–5 ч.
2. ДАФБ, индуцированных теплом и оптическим излучением с длиной волны, соответствующей переходу димолей молекулярного кислорода в синглетное состояние, генерируют активные формы кислорода.
3. Активные формы кислорода, продуцируемые ДАФБ, способны повреждать ДНК *in vitro* и *in vivo*.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 39 работ, включая 10 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов кандидатских диссертаций, и 29 тезисов конференций.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность научных результатов данной работы подтверждается корректностью постановки экспериментов, широкой апробацией и надежностью примененных методов. Основные результаты диссертационного исследования представлены на 14,16,17,18,21-й Международных Школах-конференциях «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010, 2012, 2013, 2014, 2017), на III Всероссийском конгрессе «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, 2010), на Российской научной конференции с международным участием «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии» (Санкт-Петербург, 2011), на Международных конференциях молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика '11, '12, '13» (Пушино, 2011, 2012, 2013), на X Международном симпозиуме «Биологические механизмы старения» (Харьков, 2012), на VI Международном конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2012), на VIII, IX Международной крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, 2012, 2013), на X Международном Симпозиуме «Биологическая подвижность: новые факты и гипотезы» (Пушино, 2014), на VII Съезде по радиационным исследованиям (Радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) (Москва, 2014), на Международной конференции «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (Дубна, 2016), на конференциях «Теоретическая и экспериментальная биофизика '17, '18, '19» (Пушино, 2017, 2018, 2019).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (3 главы), главы материалов и методов исследования, полученных результатов (3 главы), их обсуждения, заключения, выводов, списка основных сокращений и обозначений и списка литературы (297 источников). Работа иллюстрирована 22 рисунками и содержит 7 таблиц.

Список принятых сокращений. АФК – активные формы кислорода, БГГ – бычий гамма-глобулин, БСА – бычий сывороточный альбумин, Г – гуанин, ГК – гидролизат казеина, ДАФБ – долгоживущие активные формы белков, ИФА – иммуноферментный анализ, ККК – кумарин-3-карбоновая кислота, МЯ – микроядра, OH^- – гидроксильный ион, $\cdot\text{OH}$ – гидроксильный радикал, $\text{HO}_2\cdot$ – гидропероксидный радикал, $\text{O}_2^{\cdot-}$ – супероксид анион-радикал, $^1\text{O}_2$ – синглетный кислород, ПХЭ – полихроматофильные эритроциты, СОД – супероксиддисмутаза, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, 7-ОН-ККК – 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота, 8-ОГ – 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-оксогуанин).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах были использованы самцы аутбредных мышей Kv: SHK в возрасте от пяти до шести недель и весом 18-22 г. Животные содержались в виварии при температуре $23 \pm 3^\circ\text{C}$ и получали стандартную диету со свободным доступом к гранулированному коммерческому корму для мышей (Арно, Москва) и водопроводной воде. Работа с животными проводилась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных и с соблюдением норм биоэтики и комиссии по биоэтике и биологической безопасности ИТЭБ РАН.

Белки и сыворотка. Перед воздействием лазерного излучения или тепла исследуемые белки (бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), бычий гамма-глобулин (Serva, Германия)) и сыворотку крови (Innova, Австралия) растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (10 мМ Na_2HPO_4 и 150 мМ NaCl , pH 7,4).

Воздействие тепла и оптического электромагнитного излучения. В качестве источника оптического излучения использовали гелий-неоновый лазер ЛГН 208А (МедАппаратура, Россия) с длиной волны 632,8 нм (мощность 1,7 мВт, плотности потока $0,7 \text{ мВт/мм}^2$). Белки растворяли в ФСБ, облучали в стеклянных флаконах, обернутых алюминиевой фольгой. Спектральные характеристики световых потоков определяли с помощью автоматизированного спектрометрического комплекса МДР-41 (ОКБ Спектр, Россия) в диапазоне от 200 нм до 1000 нм. Дозиметрию оптических излучений осуществляли с помощью прибора Field Master (Coherent, США). Образцы нагревали с помощью жидкостного ультратермостата U-10 (Prüfgeräte-Werk Medingen, Германия) точно до $0,1^\circ\text{C}$. После нагревания образцы охлаждались до 25°C и выдерживались в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин.

Долгоживущие активные формы белков. Образование ДАФБ исследовали с помощью хемилюминесценции растворов белков, индуцированной тепловым воздействием (2 ч, $35\text{--}50^\circ\text{C}$) или лазерным излучением с использованием высокочувствительного хемилюминометра Биотокс-7АМ (Экон, Россия). После воздействия все образцы выдерживались в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин. Измерения проводились в темноте при комнатной температуре в 20 мл пластиковых полипропиленовых флаконах (Beckman, США) [Bruskov et al., 2012]. Использование больших по

сравнению со стандартными (0,1 мл) объемов позволило повысить чувствительность почти в 200 раз.

Определение концентрации пероксида водорода. Использовали высокочувствительный метод усиленной хемилюминесценции в системе люминол – пара-йодфенол – пероксидаза хрена [Брусков и др., 2003]. Регистрацию величины хемилюминесценции осуществляли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Бета-1, работающего в режиме счета одиночных фотонов [Bruskov et al., 2012]. После воздействия все образцы выдерживались в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин. Чувствительность метода позволяет определять H_2O_2 в концентрации около 0,1 нМ [Gudkov et al., 2019]. Содержание H_2O_2 рассчитывали, используя калибровочные графики зависимости интенсивности хемилюминесценции от известной концентрации пероксида водорода. Исходную концентрацию H_2O_2 , используемую для калибровки, определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм с использованием коэффициента молярного поглощения $43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [Штаркман и др., 2008а].

Определение концентрации гидроксильных радикалов. Для определения концентрации гидроксильных радикалов использовали специфичный для ОН-радикалов флуоресцентный зонд – кумарин-3-карбоновую кислоту (ККК) [Manevich et al., 1997]. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian, Австралия) с $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ нм}$. Калибровку производили с помощью коммерческой 7-ОН-ККК [Черников и др., 2007].

Определение концентрации растворенного кислорода. Растворы белков и сыворотки крови дополнительно насыщали аргоном или кислородом путем барботирования в течение 15 мин [Bunkin et al., 2016]. Концентрацию кислорода в растворе измеряли с помощью оксиметрического электрода ДКТП 2,4 на приборе Эксперт-001 (Эконикс, Россия).

Микроядерный тест. Сыворотку крови вводили мышам внутривенно в конечной концентрации 5 мг/г. Облучение животных проводили при комнатной температуре на рентгеновской терапевтической установке РУТ-15 (15 мА, 200 кВ) (МосРентген, Россия) при мощности дозы 1 Гр/мин (фокусное расстояние 37,5 см). Цитогенетические повреждения клеток красного мозга мышей определяли по образованию ПХЭ, содержащих МЯ. Мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации через 28 ч после облучения. Гистологические препараты готовили и окрашивали по стандартной методике с некоторыми модификациями [Asadullina et al., 2010]. ПХЭ, содержащие МЯ, подсчитывали с помощью светового микроскопа “МикМед-2” (ЛОМО, Россия) с иммерсионным объективом при увеличении $\times 1000$ [Garmash et al., 2014].

Иммуноферментный анализ. Определение 8-ОГ в ДНК проводили иммуноферментным анализом с применением моноклональных антител, специфичных к 8-ОГ [Bruskov et al., 2002]. Чувствительность данного метода ИФА позволяет определить несколько фемтомолей 8-ОГ в 40 мкг ДНК.

Статистический анализ. Данные анализировались параметрическими методами. Этот выбор обоснован предварительным анализом характера распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка, который не выявил

отклонений от нормальности. На графиках и таблицах представленные данные являются средними значениями выборки $\bar{X}$, указана стандартная ошибка среднего арифметического (SEM). Для сравнения с контролем использовался t-критерий Стьюдента, в качестве поправки на множественные сравнения применялась поправка Бонферрони. Наблюдаемая разница считалась статистически значимой при $p < 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла или оптического электромагнитного излучения

Методом собственной хемилюминесценции изучено влияние воздействия лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм, соответствующей максимуму в спектре поглощения молекулярного кислорода, или тепла (40°C, 2 ч). На Рисунке 1, А показана зависимость интенсивности хемилюминесценции растворов БСА и БГГ, подвергнутых воздействию излучения от концентрации белков. Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации БСА и БГГ имела двухфазную форму. Люминесценция растворов была максимальна при ≈ 10 мкМ БСА и ≈ 2 мкМ БГГ. Эти концентрации использовались в дальнейшем для определения периода полураспада ДАФБ. Учитывая молекулярные массы БСА и БГГ (67 и 150 кДа, соответственно, соотношение 1:2,24) и концентрации этих белков, соответствующих максимальным значениям хемилюминесценции (0,67 г/л для БСА и 0,3 г/л для БГГ; отношение 1:2,23), можно сделать вывод о том, что величина люминесцирующих продуктов, образующихся под действием оптического излучения на единицу массы этих белков, приблизительно одинакова.

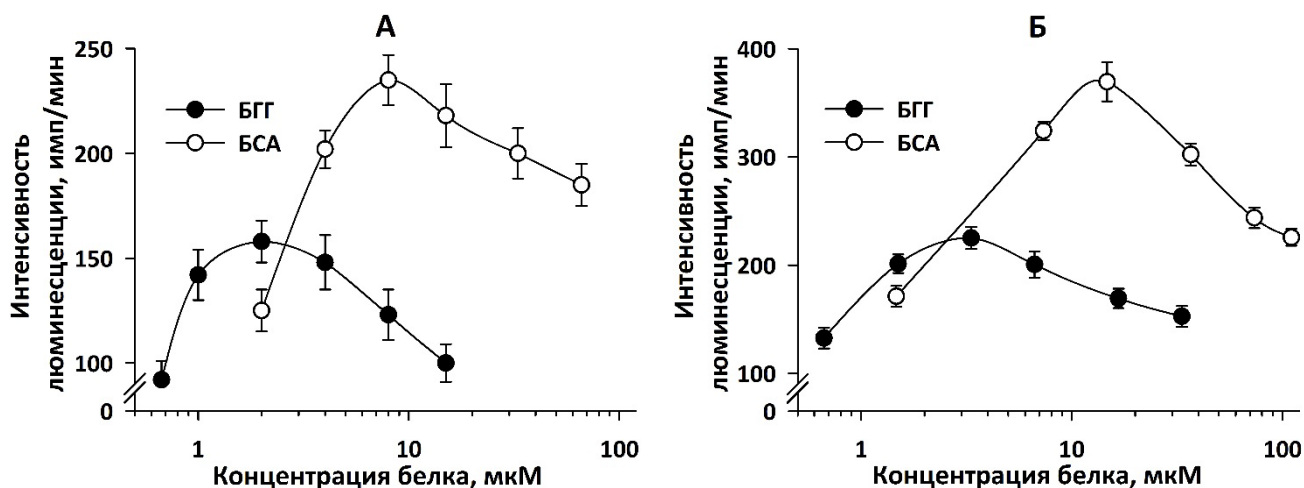


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации БСА и БГГ, подвергнутых воздействию лазерного излучения (632,8 нм, 15 мин) (А) или тепла (40°C, 2 ч) (Б) (n=3)

На Рисунке 1, Б показана зависимость интенсивности хемилюминесценции растворов БСА и БГГ, подвергнутых воздействию тепла (40°C, 2 ч), от концентрации белков. Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации БСА и БГГ имела двухфазную колоколообразную форму. При концентрации 15 мкМ БСА и 3 мкМ БГГ хемилюминесценция растворов

достигала максимальных значений. Эти концентрации белков использовали для определения времени полужизни ДАФБ по уменьшению величины хемилюминесценции после теплового воздействия. Таким образом, установлено, что под действием тепла и оптического электромагнитного излучения происходит генерация ДАФБ БСА и БГГ, зависящая от их концентрации.

Облучение белковых растворов He-Ne лазером с длиной волны 632,8 нм в течение 10–30 мин при концентрациях БСА и БГГ при максимальном уровне хемилюминесценции, приводило к образованию ДАФБ (Рисунок 2). Уменьшение интенсивности хемилюминесценции со временем после облучения позволяет определить период полужизни ДАФБ (Рисунок 2, А и Б). Основной закон радиоактивного распада имеет вид: $N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$. Средний период полураспада $T_{1/2}$ соответствует двукратному уменьшению интенсивности хемилюминесценции: $N_0 / 2 = N_0 \cdot e^{-\lambda T_{1/2}}$. Следовательно, период полужизни ДАФБ равняется: $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda$. Интенсивность хемилюминесценции экспоненциально уменьшается от времени после воздействия. Уравнение экспоненты для БСА 30 мин – $y = 538 \cdot e^{-0,1404x}$ ($T_{1/2} \approx 4,94$), 15 мин – $y = 274 \cdot e^{-0,1312x}$ ($T_{1/2} \approx 5,28$), 10 мин – $y = 186 \cdot e^{-0,1477x}$ ($T_{1/2} \approx 4,69$); для БГГ 30 мин – $y = 376 \cdot e^{-0,1360x}$ ($T_{1/2} \approx 5,1$), 15 мин – $y = 183 \cdot e^{-0,1267x}$ ($T_{1/2} \approx 5,47$), 10 мин – $y = 151 \cdot e^{-0,2621x}$ ($T_{1/2} \approx 2,64$). Период полужизни радикалов БСА и БГГ составил около 4-5 ч после действия оптического излучения. Увеличение времени воздействия оптического излучения на белковые растворы как БСА, так и БГГ сопровождается пропорциональным увеличением интенсивности хемилюминесценции (Рисунок 2, В).

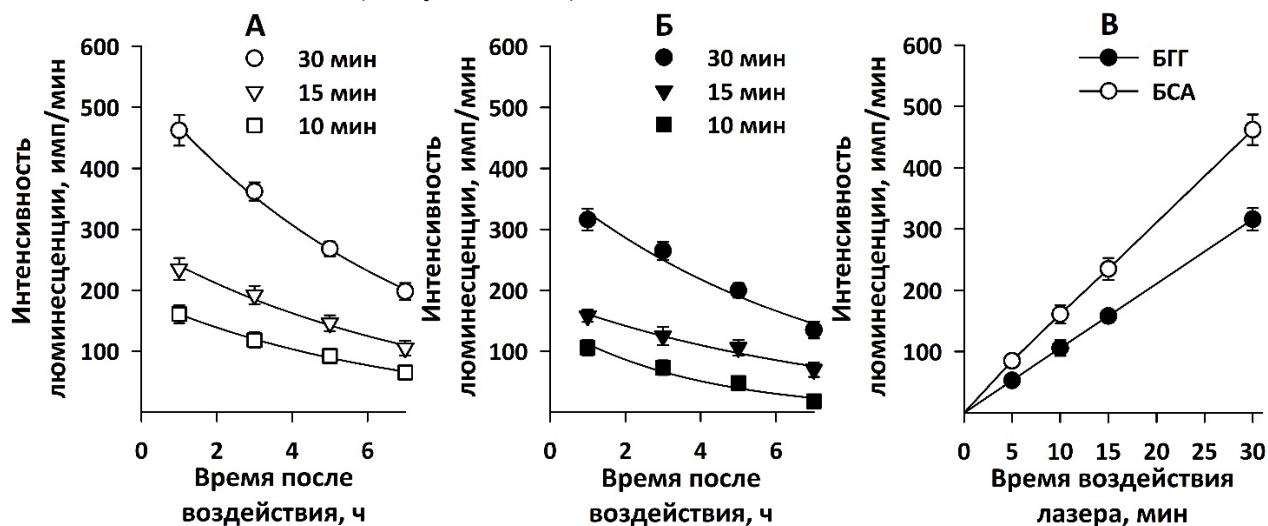


Рисунок 2 – Изменение интенсивности хемилюминесценции растворов (А) БСА (10 мкМ) и (Б) БГГ (2 мкМ) при различной продолжительности инкубации после воздействия лазерного излучения (632,8 нм). (В) Зависимость хемилюминесценции растворов БСА (10 мкМ) и БГГ (2 мкМ) от времени воздействия лазерного излучения (632,8 нм) (n=3)

Далее установлено, что нагревание белковых растворов (35–50°C, 2 ч) при концентрации БСА 15 мкМ и БГГ 3 мкМ в фосфатно-солевом буфере приводило к образованию ДАФБ (Рисунок 3). Увеличение температуры от 35 до 40°C сопровождалось двукратным увеличением интенсивности хемилюминесценции белков, а до 50°C – трехкратным. Интенсивность хемилюминесценции экспоненциально уменьшается от времени после нагревания.

Уравнение экспоненты для БСА $50^{\circ}\text{C} - y = 800 \cdot e^{-0,1813x}$ ($T_{1/2} \approx 3,82$), $40^{\circ}\text{C} - y = 448 \cdot e^{-0,1848x}$ ($T_{1/2} \approx 3,75$), $35^{\circ}\text{C} - y = 198 \cdot e^{-0,1490x}$ ($T_{1/2} \approx 4,65$); для БГГ $50^{\circ}\text{C} - y = 415 \cdot e^{-0,1526x}$ ($T_{1/2} \approx 4,54$), $40^{\circ}\text{C} - y = 256 \cdot e^{-0,1495x}$ ($T_{1/2} \approx 4,64$), $35^{\circ}\text{C} - y = 153 \cdot e^{-0,1667x}$ ($T_{1/2} \approx 4,16$). Время полужизни радикалов БСА и БГГ составляло около 4-5 ч при воздействии тепла в диапазоне $35\text{--}50^{\circ}\text{C}$. При этом интенсивность хемилюминесценции белковых растворов зависела от концентрации растворенного кислорода (кислородный эффект) (Рисунок 3, В). Следовательно, с увеличением температуры образование ДАФБ возрастает и растёт с увеличением концентрации растворенного кислорода.

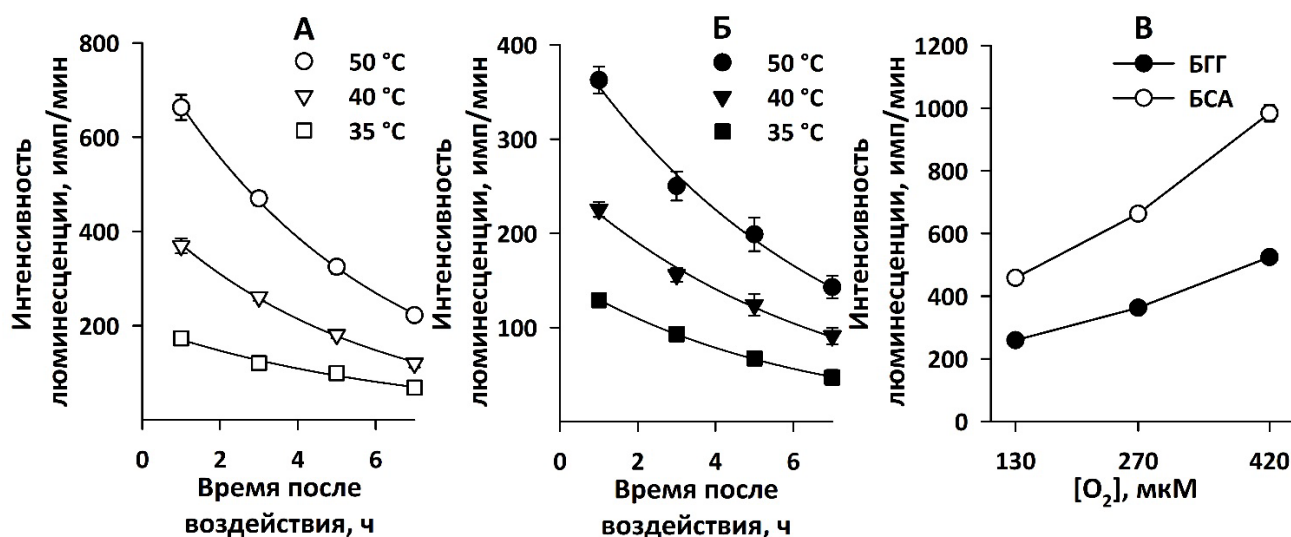


Рисунок 3 – Изменение интенсивности хемилюминесценции растворов (А) БСА (15 мкМ) и (Б) БГГ (3 мкМ) при различной продолжительности инкубации после действия тепла ($35\text{--}50^{\circ}\text{C}$, 2 ч). (В) Зависимость хемилюминесценции растворов БСА (15 мкМ) и БГГ (3 мкМ) после действия тепла (40°C , 2 ч), от концентрации растворенного кислорода ($n=3$)

Таким образом, установлено, что под действием тепла и лазерного излучения в сыворотке крови и водных растворах сывороточных белков происходит образование ДАФБ. В опубликованной литературе известны примеры образования радикальных продуктов не только на белках, но и на пептидах, поэтому также была исследована способность желатина, казеина и гидролизата казеина (ГК) к образованию ДАФБ под воздействием тепла. В результате было показано, что умеренная гипертермия приводит к образованию ДАФБ вследствие окисления белков, и этот эффект существенно выше у ГК по сравнению с казеином и желатином. Люминесценция растворов была максимальна при концентрации 0,4 г/л как для желатина, казеина, так и для ГК.

2. Образование активных форм кислорода под действием долгоживущих активных форм белков, индуцированное теплом или оптическим электромагнитным излучением

Исследовано образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и БГГ под влиянием тепла. Зависимость генерации H_2O_2 после теплового воздействия (45°C , 2 ч) от концентрации БСА и БГГ показана на Рисунке 4, А. В случае БГГ наблюдалась двухфазная зависимость образования H_2O_2 после нагревания с четко выраженным максимумом при 1–2 мкМ белка. Для БСА двухфазная зависимость была более пологая с наибольшим значением H_2O_2 при

10 мкМ белка. Максимальная концентрация H_2O_2 , которая образовывалась в белковых растворах под действием тепла, составляла около 40 нМ. Также исследовали образование H_2O_2 при воздействии He-Ne лазерного излучения на белковые растворы БСА и БГГ. Зависимость генерации H_2O_2 после воздействия лазерного излучения в течение 15 мин от концентрации БСА и БГГ представлена на Рисунке 4, Б. В случае БГГ зависимость является двухфазной с четко определенным максимумом при концентрации 2 мкМ. Зависимость для БСА также двухфазная, но более уплощенная с максимумом генерации H_2O_2 при концентрации около 8 мкМ. Максимальная концентрация H_2O_2 , которая образовывалась в белковых растворах под действием лазерного излучения, составляла около 4–6 нМ.

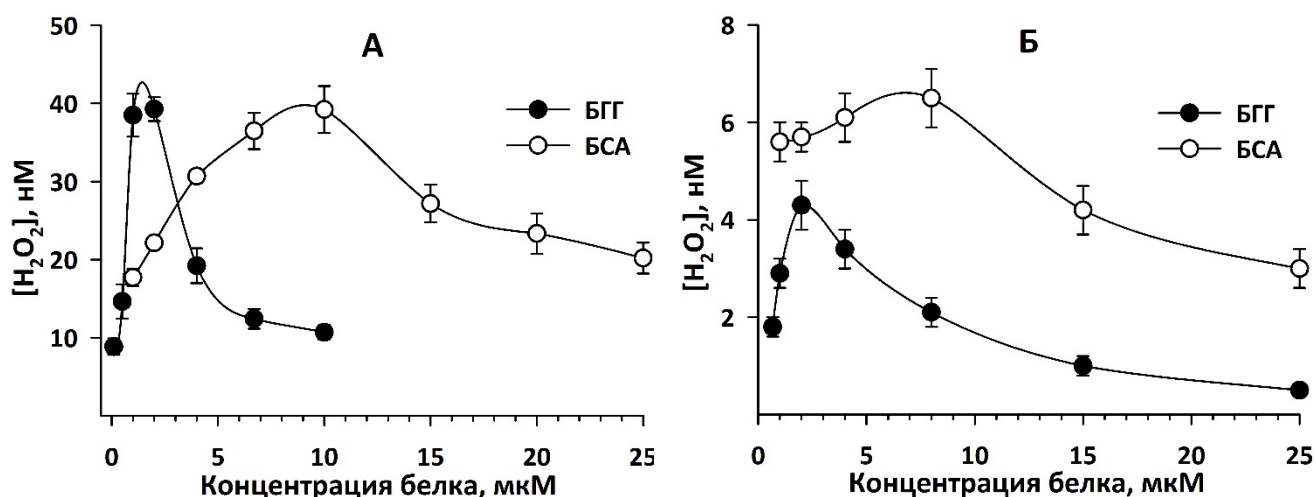


Рисунок 4 – Концентрационная зависимость образования H_2O_2 в растворах БСА и БГГ, индуцированное нагреванием (45 °С, 2 ч) (А) или лазерным излучением (632,8 нм, 15 мин) (Б) (n=3)

Было установлено, что образование H_2O_2 под действием лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм линейно зависит от времени воздействия в диапазоне 5–30 мин (Рисунок 5). Скорость образования H_2O_2 в растворе БСА около 0,4 нМ/мин, а в растворе БГГ – 0,3 нМ/мин.

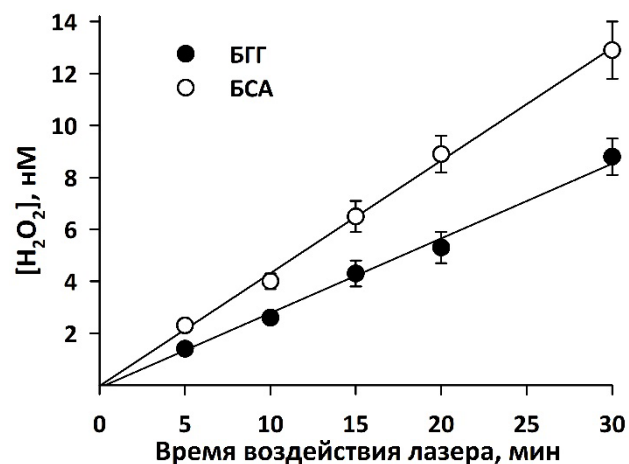


Рисунок 5 – Зависимость генерации пероксида водорода в растворах БСА и БГГ от времени воздействия лазерного излучения (632,8 нМ) (n=3)

Концентрации БСА и БГГ, которые соответствуют максимальной генерации H_2O_2 , использовались для измерения содержания H_2O_2 в течение 6 ч после воздействия лазерного излучения или тепла. В контрольных растворах без белков (бидистиллированной воде и ФСБ) концентрация H_2O_2 составляла около

4–5 нМ и уменьшалась к 6 ч до 1 нМ (Рисунок 6, А). В растворе БСА наблюдалось плавное увеличение концентрации H_2O_2 в течение 4 ч $\approx$ с 35 до 45 нМ, а затем быстрое ее уменьшение $\approx$ до 21 нМ к 6 ч. В случае БГГ происходил рост его концентрации в течение 1 ч $\approx$ с 28 нМ до 39 нМ с последующим уменьшением к 6 ч примерно до 13 нМ. По-видимому, в течение времени полужизни ДАФБ, которое составляет около 4–5 ч, происходит интенсивная генерация H_2O_2 , приводящая к росту ее концентрации для БСА в течение 4 ч и 1 ч в случае БГГ с последующим распадом. При лазерном воздействии (Рисунок 6, Б) в растворе БСА наблюдалось плавное увеличение концентрации H_2O_2 в течение 3 ч $\approx$ с 4,5 до 9 нМ с последующим ее медленным падением до 6 нМ. В случае БГГ концентрация H_2O_2 увеличилась в течение первого часа до 4,3 нМ, а затем постепенно уменьшалась (Рисунок 6, Б).

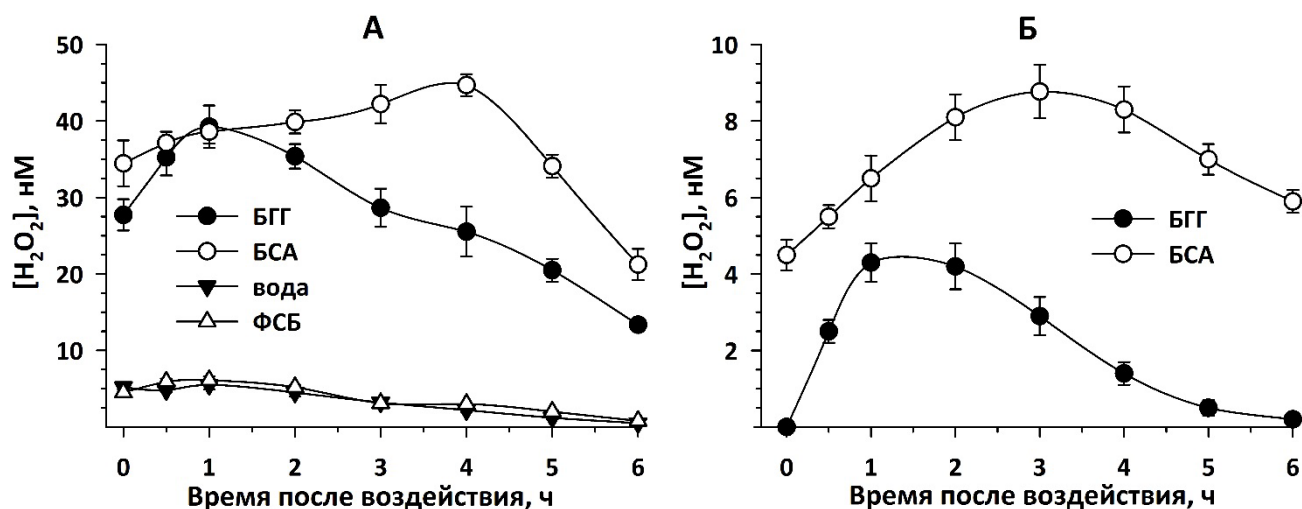


Рисунок 6 – Образование пероксида водорода, индуцированное в растворах БСА (10 мкМ) и БГГ (2 мкМ) через разные промежутки времени после их нагревания (45 °С, 2 ч) (А) или после их лазерного облучения (632,8 нм, 15 мин) (Б) (n=3)

С помощью флуоресцентного зонда ККК, продукт гидроксирования которого, 7-ОН-ККК, интенсивно флуоресцирует, измерили образование гидроксильных радикалов в растворах БСА и БГГ после воздействия на них лазерного излучения в течение 30 мин и после 2 ч нагревания при 45°С. После воздействия лазерного излучения содержание 7-ОН-ККК составляло $3,5 \pm 0,5$ нМ для БСА и $5,2 \pm 0,7$ нМ для БГГ (n = 3), после нагревания – $9,2 \pm 1,0$ нМ для БСА и $15,2 \pm 1,9$ нМ для БГГ (n = 3).

Для выяснения механизма образования H_2O_2 в растворе БСА под действием лазерного излучения или тепла было изучено влияние на этот процесс различных факторов (Таблица 1). Установлен кислородный эффект – влияние концентрации растворенного кислорода на образование H_2O_2 под действием ДАФБ. Концентрация H_2O_2 , генерируемого ДАФБ, в растворе, дополнительно насыщенном кислородом в течение 15 мин до начала воздействия, была в 1,5–1,6 раза выше. При насыщении раствора БСА аргоном под действием лазерного излучения или тепла образовалось на 40 % меньше H_2O_2 . Известно, что в присутствии D_2O увеличивается время жизни синглетного кислорода [Ryter, Turrel, 1998]. В растворе белка, содержащем 25 об. % D_2O , концентрация H_2O_2 при данных воздействиях увеличивалась в 1,2–1,3 раза. Азид натрия, тушитель

синглетного кислорода, уменьшал ДАФБ-индуцированную генерацию H_2O_2 на 40 % для лазерного излучения или на 30 % для тепла. Эти данные свидетельствуют об участии $^1\text{O}_2$ в образовании H_2O_2 . Влияние супероксиддисмутазы (СОД) показало, что супероксид анион-радикалы также участвуют в образовании H_2O_2 под действием ДАФБ. СОД увеличивала концентрацию H_2O_2 на 30 % за счет дополнительной дисмутации этих радикалов, а добавление тирона, спиновой ловушки супероксид анион-радикалов, снижало концентрацию H_2O_2 на 30 %.

Таблица 1 – Влияние различных факторов на образование пероксида водорода в растворе БСА (10 мкМ) под действием лазерного излучения (*He-Ne*, 632,8 нм, 15 мин) и в растворе БСА (15 мкМ) под действием тепла (*kT*, 45°C, 2 ч) ($n=3$)

Воздействие	[O ₂], мкМ	<i>He-Ne</i>		<i>kT</i>	
		$\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$, нМ	К	$\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$, нМ	К
Контроль	270	$6,5 \pm 0,6$	1	$39,2 \pm 3,0$	1
Насыщение O ₂ **	420	$9,8 \pm 0,8$ *	1,5	$61,7 \pm 3,7$ *	1,6
Насыщение Ar **	130	$3,8 \pm 0,3$ *	0,6	$23,8 \pm 1,6$ *	0,6
D ₂ O (25 об. %)	270	$8,4 \pm 0,6$ *	1,3	$47,6 \pm 0,8$ *	1,2
NaN ₃ (0,1 мкМ) ***	270	$3,8 \pm 0,4$ *	0,6	$28,0 \pm 2,6$ *	0,7
Тирон (100 нМ)	270	$4,3 \pm 0,2$ *	0,7	$25,5 \pm 3,6$ *	0,7
СОД (10^{-3} ед./мл)	270	$8,7 \pm 0,6$ *	1,3	$49,3 \pm 2,4$ *	1,3

К – изменение концентрации H_2O_2 под влиянием изучаемого агента относительно контроля.

* – статистически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$).

** – раствор БСА насыщался в течение 15 мин газом перед воздействием тепла и оптического электромагнитного излучения путем барботирования.

*** – в указанной концентрации азид натрия не оказывал заметного ингибирующего влияния на активность пероксидазы.

Таким образом, установлено, что ДАФБ, индуцированных теплом или оптическим излучением, способны приводить к длительной генерации H_2O_2 и образованию гидроксильного радикала. С помощью ингибиторного анализа показано, что в процессе генерации пероксида водорода ДАФБ в белковых растворах участвуют синглетный кислород и супероксид анион-радикалы.

3. Генотоксическое действие долгоживущих активных форм белков, индуцированных теплом или оптическим электромагнитным излучением

Ранее установлено, что ДАФБ способны повреждать другие биомолекулы. При этом наиболее существенным является повреждение молекул ДНК. Среди всех повреждений ДНК, 8-ОГ является ключевым биомаркером окислительных повреждений ДНК [Bruskov et al., 2002a; Chernikov et al., 2017]. Способность сыворотки крови, подвергнутой воздействию лазерного излучения или тепла, приводить к образованию 8-ОГ в ДНК, представлена на Рисунке 7, А. Показано, что при инкубации сыворотки крови, подвергнутой лазерному воздействию, с ДНК образовалось около 31 молекулы 8-ОГ на миллион молекул гуанинов (Г) в ДНК (Рисунок 7, А, *He-Ne*). В случае, если сыворотку крови подвергали гипертермии, наблюдалось образование порядка 14 молекулы 8-ОГ на миллион молекул Г в ДНК (Рисунок 7, А, *kT*). Используемая в качестве контроля нативная сыворотка крови не приводила к появлению повреждений ДНК.

В качестве сравнения использовали ДНК, подвергнутую воздействию ионизирующей радиации (Рисунок 7, А, *X-Ray*), в этом случае образовалось порядка 78 молекул 8-ОГ на миллион молекул Г в ДНК. Линейная зависимость наблюдалась в диапазоне доз 5–20 Гр (Рисунок 7, Б).

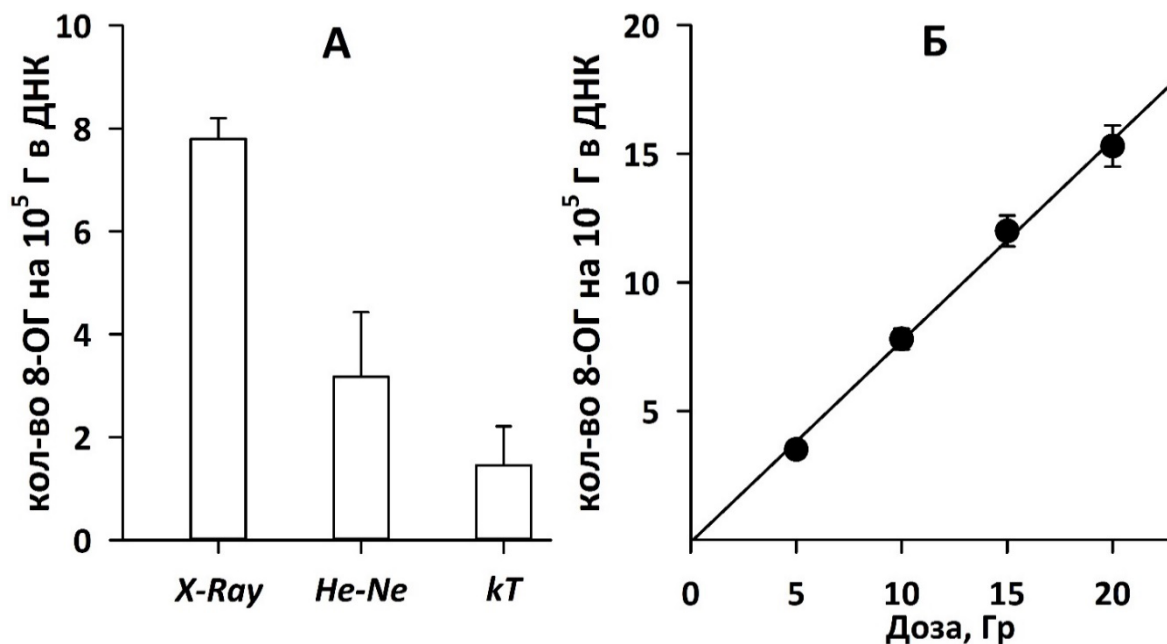


Рисунок 7 – Влияние сыворотки крови, подвергнутой воздействию лазерного излучения (632,8 нм, 30 мин) или тепла (45°C, 2 ч), на образование 8-ОГ в ДНК *in vitro* (А). Соотношение масс ДНК/белок примерно 10/1. *X-Ray* – Воздействие на ДНК ионизирующей радиации в дозе 10 Гр. *He-Ne* – инкубация ДНК в течение 2 ч с сывороткой крови, подвергнутой воздействию He-Ne лазера. *kT* – инкубация ДНК в течение 2 ч с сывороткой крови, подвергнутой воздействию тепла 45°C. (Б) Зависимость образования 8-ОГ в ДНК *in vitro* от поглощенной дозы ионизирующей радиации (n=3)

Как показано выше, ДАФБ могут повреждать молекулы ДНК *in vitro*. Однако возможность ДАФБ белков сыворотки крови повреждать молекулы ДНК *in vivo* осталась неясной. Система кроветворения является высокочувствительной к действию окислительного стресса. Одним из наиболее изученных и применяемых методов определения повреждений кроветворной системы является образование микроядер в клетках-предшественниках эритроцитов. На Рисунке 8 представлено влияние сыворотки крови, подвергнутой воздействию He-Ne лазера или гипертермии, на образование микроядер (МЯ) в полихроматофильных эритроцитах мышей (ПХЭ) *in vivo*. Было показано, что введение как интактной, так и обработанной физическими факторами сыворотки не приводит к увеличению количества МЯ в ПХЭ. Поскольку нам не удалось обнаружить влияние сывороток крови, мы использовали метод «проявляющей дозы». Метод позволяет опосредованно изучать слабые воздействия на биологические системы. Суть заключается в изучении слабого воздействия на фоне более сильного. Обычно вначале на живую систему влияют слабым воздействием, а спустя 5–8 ч сильным. Если слабое воздействие влияет на изучаемый фактор, то через некоторое время развивается устойчивость к поражающему действию сильного воздействия в результате адаптивного эффекта. На Рисунке 8 показано, что облучение мышей в дозе 1 Гр существенно увеличивало количество ПХЭ, содержащих МЯ.

Введение нативной сыворотки крови существенно не изменяло ситуацию, а вот введение мышам сывороток крови, подвергнутых воздействию лазерного излучения или тепла, приводило к развитию адаптивного эффекта, уменьшая количество ПХЭ с МЯ в среднем на 15 %.

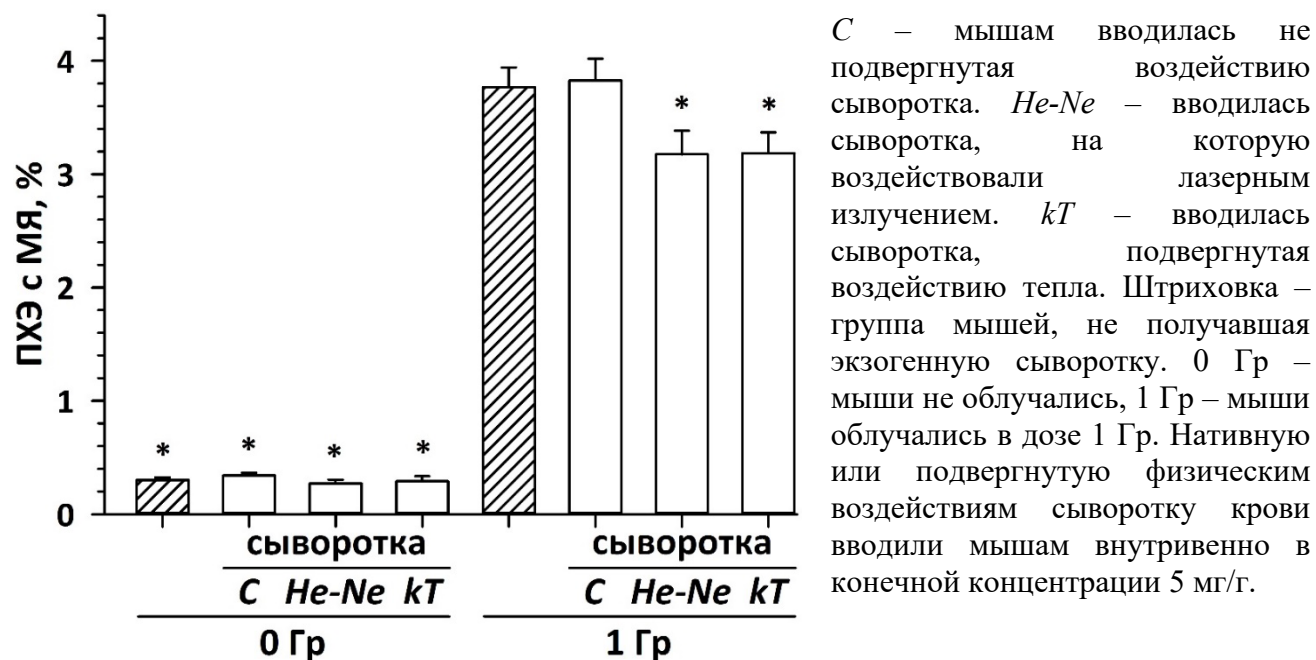


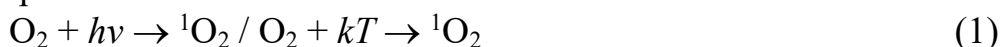
Рисунок 8 — Влияние мышинной сыворотки крови, подвергнутой воздействию лазерного излучения (He-Ne, 632,8 нм, 30 мин) или тепла (kT, 45°C, 2 ч), на образование микроядер в полихроматофильных эритроцитах мышей *in vivo* (n=5). * — статистически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$)

Ранее было установлено, что длительное облучение растворов иммуноглобулинов ультрафиолетовым излучением низкой интенсивности при 312 нм приводит к образованию H_2O_2 из растворенного в белковом растворе молекулярного кислорода [Wentworth et al., 2001]. Авторы предполагали, что ключевым этапом этого процесса является переход молекулярного кислорода из триплетного в синглетное состояние [Wentworth et al., 2001]. В этих экспериментах интенсивное образование H_2O_2 под действием ультрафиолета наблюдалось только в растворах гамма-глобулинов, но не наблюдалось в случае других белков. В наших экспериментах растворы белков и растворы сыворотки крови активировали лазерным излучением с длиной волны 632,8 нм, соответствующей линии поглощения молекулярного кислорода, и воздействием повышенных температур. Установлено, что более выраженной способности БГГ генерировать H_2O_2 по сравнению с БСА не наблюдалось. В работе [Chin et al., 2008] также показано, что активация белков под действием ультрафиолетового излучения, сопровождающаяся генерацией АФК, возникает в результате возбуждения ароматических аминокислот, однако существенных отличий в этом между БГГ и БСА не выявлено [Chin et al., 2008].

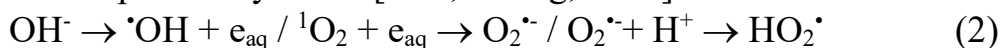
В данной работе показана двухфазная зависимость интенсивности хемилюминесценции белковых растворов (Рис. 1) и образования H_2O_2 (Рис. 4) под действием тепла и оптического электромагнитного излучения от концентрации белков с максимумом при определенной концентрации белка. Двухфазный характер указывает на существование двух конкурирующих

процессов. Такими процессами могут быть как генерация АФК и ДАФБ, так и их нейтрализация, в зависимости от концентрации белка. Первоначально с увеличением концентрации белка при воздействии излучений доминирует процесс генерации АФК за счет образования ДАФБ. Однако, при превышении определенного значения концентрации белка начинают преобладать процессы нейтрализации АФК, в частности H_2O_2 .

Как следует из таблицы 1 и данных по генерации ОН-радикалов, в ДАФБ-индуцированной генерации H_2O_2 участвуют $^1\text{O}_2$, $\text{HO}_2^\cdot$ и $^\cdot\text{OH}$. Принимая во внимание образование АФК в воде под действием тепла и оптических излучений с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода [Черников, Брусков, 2002; Смирнова и др., 2005; Гудков и др., 2012; Gudkov et al., 2011], может быть предложена следующая последовательность сопряженных реакций, приводящих к образованию ДАФБ и H_2O_2 в белковых растворах:

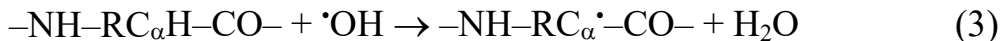


где $h\nu$ – квант энергии электромагнитного излучения, соответствующий переходу кислорода в синглетное состояние [Zakharov et al., 2014], а kT – тепловая энергия излучения [Ahn, Chung, 2012].



где e_{aq} – гидратированный электрон.

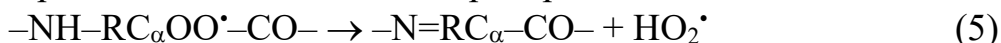
Реакция $^\cdot\text{OH}$ с атомом водорода при α -углеродном атоме полипептидной цепи приведет к его отрыву и образованию α -углеродного радикала [Lindquist, Craig, 1988; Davies, 2005]:



Реакция с кислородом приводит к образованию пероксильного радикала в белках [Lindquist, Craig, 1988; Davies, 2005]:



Далее происходит элиминация гидропероксида



и образование пероксида водорода за счет дисмутации гидропероксидных радикалов: $\text{HO}_2^\cdot + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + ^1\text{O}_2$ (6)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе экспериментально подтверждено участие синглетного кислорода, гидроксильных и супероксид анион-радикалов в образовании H_2O_2 . Выявлено новое фундаментальное свойство сывороточных белков: под действием лазерного излучения или тепла в присутствии растворенного кислорода воздуха, они могут превращаться в ДАФБ, которые впоследствии генерируют H_2O_2 в течение длительного периода времени, в результате сопряженных электрон-радикальных цепных автокаталитических реакций [Chin et al., 2008; Bruskov et al., 2012].

Известно, что у млекопитающих H_2O_2 выступает в качестве вторичного мессенджера в концентрациях от нескольких единиц до сотен наномоль на литр [Stone, Yang, 2006; Sies et al., 2017]. Если сравнивать концентрации H_2O_2 , образующиеся при воздействии ДАФБ, индуцированных лазерным излучением

или ионизирующей радиацией, то концентрация порядка 20 нМ, показанная в данной работе, образуется при дозе 0,25 Гр ($10 \text{ нМ} \approx 0,15 \text{ Гр}$). Следует подчеркнуть, что в данных экспериментах определена средняя концентрация H_2O_2 в сильно разбавленных растворах. В то время как его локальная концентрация вблизи поверхности белка может быть существенно выше. Поскольку концентрация белков сыворотки крови в организме млекопитающих и человека более чем на два порядка выше, чем концентрации БСА и БГГ, использованные в данных экспериментах, оценки, полученные с помощью экстраполяции, показывают, что долговременная генерация H_2O_2 под действием активированных лазерным излучением или теплом сывороточных белков в естественных условиях может достигать даже микромолярных концентраций.

В данной работе выявлен повреждающий потенциал ДАФБ, как *in vitro* (Рисунок 7), так и *in vivo* (Рисунок 8). ДАФБ являются одной из форм окисленных модификаций белков, приводящие к их фрагментации и агрегации, а также генерации АФК и продлению окислительного стресса. Оптическое воздействие с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода, и умеренная гипертермия во время физиотерапевтических процедур в медицинской практике могут сопровождаться образованием ДАФБ [Gudkov et al., 2017]. В свою очередь пероксид водорода, генерируемый под действием ДАФБ, может участвовать в сигнальных путях и вызывать адаптивную реакцию у людей [Stone, Yang, 2006; Forman et al., 2010; Silachev et al., 2014; Simon et al., 2016; Smirnova et al., 2018; Zakharova et al., 2018]. Несмотря на это, следует принимать во внимание, что индуцируемое оптическим излучением или теплом образование активных форм кислорода, которое превышает уровень антиоксидантной и репарационной систем клеток, может сопровождаться продолжительным окислительным стрессом и риском отдаленных патологических последствий, подобно воздействию ионизирующей радиации.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в растворах бычьего сывороточного альбумина, гамма-глобулина, желатина, казеина и гидролизата казеина и в растворах сыворотки крови под действием тепла и оптического электромагнитного излучения происходит образование долгоживущих активных форм белков с временами полужизни около 4–5 ч.
2. Установлено, что долгоживущие активные формы белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением, способны длительно генерировать H_2O_2 . Показано, что в процессе генерации H_2O_2 участвуют синглетный кислород, гидроксильный и супероксид анион-радикалы.
3. Долгоживущие активные формы белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением, приводят к окислительным повреждениям ДНК *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК СТАТЕЙ В ЖУРНАЛАХ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК

1. **Ivanov V.E.**, Usacheva A.M., Chernikov A.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins induced by low-intensity irradiation of helium-neon laser and their involvement in the generation of reactive oxygen species // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2017. V. 176. P. 36-43.
2. **Ivanov V.E.**, Karp O.E., Bruskov V.I., Andreev S.N., Bunkin N.F., Gudkov S.V. Formation of long-lived reactive products in blood serum under heat treatment and low-intensity laser irradiation, their role in hydrogen peroxide generation and DNA damage // Indian J. Biochem. Biophys. 2019. V. 56. P. 214-223.
3. Bruskov V.I., Popova N.R., **Ivanov V.E.**, Karp O.E., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins by the action of heat // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 443(3). P. 957-961.
4. Shkirin A.V., Suyazov N.V., Chirikov S.N., **Ivanov V.E.**, Gudkov S.V. Kinetics of the Light-Oxygen Effect in Aqueous Solutions of Proteins. // Bulletin of the Lebedev Physics Institute. 2020. V. 47(3). P. 76-81.
5. Bruskov V.I., Chernikov A.V., **Ivanov V.E.**, Karmanova E.E., Gudkov S.V. Formation of the Reactive Species of Oxygen, Nitrogen, and Carbon Dioxide in Aqueous Solutions under Physical Impacts // Phys. Wave Phenom. 2020. V. 28(2). P. 103-106.
6. Bruskov V.I., Karmanova E.E., Chernikov A.V., Usacheva A.M., **Ivanov V.E.**, Emel'yanenko V.I. Formation of Hydrated Electrons in Water under Thermal Electromagnetic Exposure // Phys. Wave Phenom. 2021. V. 29(2). P. 94-97.
7. **Иванов В.Е.**, Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла в растворах желатина и казеина // Биофизика. 2018. Т. 63(5). С. 873-879.
8. **Иванов В.Е.**, Карп О.Э., Попова Н.Р., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование долгоживущих форм белков сыворотки крови под действием тепла // Альм. клин. мед. 2014. Т. 31. С. 17-20.
9. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А., **Иванов В.Е.**, Черников А.В., Манохин А.А., Асташев М.Е., Ягужинский Л.С., Брусков В.И. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода // Биофизика. 2012. Т. 57(1). С. 5-13.
10. Гудков С.В., **Иванов В.Е.**, Карп О.Э., Черников А.В., Белослудцев К.Н., Бобылёв А.Г., Асташев М.Е., Гапеев А.Б., Брусков В.И. Влияние биологически значимых анионов на образование активных форм кислорода в воде под действием неионизирующих физических факторов // Биофизика. 2014. Т. 59(5). С. 862-870.