

ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ РАДИКАЛОВ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ТЕПЛА

Карп О.Э., Иванов В.Е., Попова Н.Р., Куликов Д.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пуцдино, Московская область, Россия (142290, Пуцдино, Московская область, ул. Институтская, д. 3), e-mail: olgakarp1@gmail.com

Ранее установлено, что активные формы кислорода (АФК), при воздействии ионизирующего излучения, продуцируют долгоживущие радикалы белков (ДЖРБ). Так как лазерное излучение и тепловое воздействие в водных растворах вызывает образование АФК, в работе исследована и показана образование ДЖРБ белками сыворотки крови – альбумином, гамма-глобулином – под влиянием лазерного излучения и умеренной гипертермии и генерация ими АФК. С помощью хемилюминесценции растворов БСА, гамма-глобулина (ГГ), подвергнутых умеренному нагреванию, показано образование ДЖРБ с временем полужизни около 4 ч, а методом усиленной хемилюминесценции в системе люминол – пара-иодофенол – пероксидаза - длительная генерация H_2O_2 в растворах БСА и ГГ. Полученные данные свидетельствуют о том, что белки сыворотки крови – альбумины и глобулины – образуют ДЖРБ при воздействии лазерного излучения и тепла. Они могут быть компонентами системы антиоксидантной защиты для инактивации синглетного кислорода, а также играть сигнально-регуляторную роль в процессах, связанных с образованием H_2O_2 .

Ключевые слова: окислительный стресс, активные формы кислорода, долгоживущие радикалы белка, повреждения ДНК.

FORMATION OF LONG-LIVED REACTIVE PROTEIN SPECIES OF MAMMALIAN BLOOD SERUM PROTEINS EXPOSED TO LASER RADIATION AND HEAT

Karp O.E., Ivanov V.E., Popova N.R., Kulikov D.A.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia (142220, Pushchino, Moscow region, Institutskaya street, 3), e-mail: olgakarp1@gmail.com

It has been previously shown that reactive oxygen species (ROS) produce the long-lived reactive protein species (LRPS) as a result of ionizing radiation exposure. Since laser radiation and thermal effects in water solutions also result in ROS generation, this study was aimed to investigate and demonstrate the possibility of LRPS formation from the blood serum proteins – albumin and gamma-globulin – in response to moderate laser radiation and hyperthermia, as well as the production of ROS. Chemiluminescence of BSA and gamma-globulin (GG) in solutions subjected to moderate heating allowed detecting LRPS with a half-life of about 4 h, while enhanced chemiluminescence using the luminol - para-iodophenol - peroxidase system testified prolonged generation of H_2O_2 in BSA and GG solutions. The obtained data indicate the ability of blood serum proteins – albumins and globulins – to form LRPS upon laser radiation and heating. They can act as components of an antioxidant protection system required for inactivation of singlet oxygen, also playing a signaling and regulatory role in the processes related to H_2O_2 formation.

Keywords: oxidative stress, reactive oxygen species, long-lived reactive oxygen species, DNA damage.

Введение

В настоящее время в практической медицине широко используется воздействие различных физических факторов для лечения ряда заболеваний. Однако биологические механизмы их лечебного влияния остаются малоисследованными. Ранее было показано образование активных форм кислорода (АФК) в водных растворах под действием тепла [6]. Поскольку АФК выполняют сигнально-регуляторную роль в биологических процессах [9], их образование может быть важным фактором лечебного воздействия и адаптации организма к влиянию неблагоприятных факторов среды.

Цель исследования

Установление образования долгоживущих радикалов белков, образующихся в сыворотке крови при воздействии лазерного излучения и тепла. Изучение их возможной сигнально-регуляторной роли в активизации защитных систем организма.

Материалы и методы исследования

В качестве белков сыворотки крови млекопитающих были исследованы бычий сывороточный альбумин (БСА, «Sigma», США) и бычий гамма-глобулин («Serva», ФРГ).

Определение перекиси водорода проводилось с помощью усиленной хемилюминесценции в системе люминол-параоксидфенол-пероксидаза с регистрацией величины хемилюминесценции жидкостным сцинтилляционным счетчиком для измерения бета-излучения в режиме счета одиночных фотонов [5].

Для определения гидроксильных радикалов был использован селективный высокочувствительный зонд кумарин-3-карбоновая кислота, продукт реакции которой с ОН-радикалами, 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота, обладает интенсивной флуоресценцией [4].

Для обнаружения и исследования ДЖРБ нами был использован метод измерения хемилюминесценции белковых растворов, индуцированной теплом (45°C), лазерным излучением (гелий-неоновое излучение, 632.8 нм, 5 мВт) и рентгеновским излучением (рентгеновская терапевтическая установка РУТ-15, 15 мА, 200 кВ, МосРентген, Россия, мощность дозы 1 Гр/мин, фокусное расстояние 0.375 м) с помощью высокочувствительного хемилюминометра Биотокс-7АМ (АНО Инженерный центр экология, Россия).

Результаты исследования и их обсуждение

АФК в организме возникают как при нормальном клеточном метаболизме, так и при воздействии разных физико-химических факторов. При достижении АФК уровня, превышающего возможности их нейтрализации антиоксидантной системой клетки, они вызывают окислительный стресс и оказывают повреждающее действие на биологические молекулы. Значительная часть повреждений в клетке, индуцированных ионизирующей радиацией, образуются за счет короткоживущих АФК, обусловленных радиолизом воды. После воды, содержание которой в клетках составляет около 75%, основной мишенью воздействия АФК являются белки [3, 8]. Содержание белкового компонента в клетках – около 15% их массы (примерно 70% сухого веса клетки) – наибольшее среди остальных клеточных компонентов. Кроме того, белки содержат целый ряд легко окисляемых групп.

При воздействии высоких доз ионизирующего излучения в присутствии кислорода АФК, образующиеся в результате радиолиза воды, продуцируют долгоживущие радикалы белков (ДЖРБ) [8].

Установлено, что ДЖРБ являются источником вторичных свободных радикалов, вызывающих дальнейшее окисление белков и других биомолекул, включая ДНК [5, 6]. При высоких дозах облучения они могут длительное время продуцировать генерацию АФК и оказывать генотоксическое действие на ДНК [3]. Длительная генерация АФК под действием ДЖРБ может быть причиной возникновения продолжительного окислительного стресса после прекращения воздействия ионизирующей радиации. Нейтрализация АФК, продуцируемых ДЖРБ, введением в организм некоторых природных антиоксидантов способна прерывать окислительный стресс, обусловленный этим фактором [3].

Так как тепловое воздействие, как и ионизирующее излучение [4], вызывает продукцию АФК, в данной работе впервые исследовано образование ДЖРБ белками сыворотки крови – альбумином и гамма-глобулином быка – при умеренной гипертермии и показаны существование ДЖРБ и генерация ими АФК.

Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации БСА и ГГ имела двухфазную колоколообразную форму. При ~15 мкМ БСА и ~3 мкМ ГГ хемилюминесценция растворов достигала максимальных значений. Эти концентрации белков использовали для определения времени их полужизни по уменьшению величины хемилюминесценции после теплового воздействия. Учитывая молекулярные массы БСА и ГГ (67 кДа и 150 кДа соответственно; соотношение 1 : 2.24) и значения концентраций этих белков, соответствующие максимальным величинам хемилюминесценции (0.44 г/л для БСА и 1 г/л для ГГ; соотношение 1 : 2.27), было определено, что максимальное количество люминесцирующих продуктов, образующихся в результате теплового воздействия, в среднем приблизительно одинаково, в расчете на единицу массы этих белков.

Была получена зависимость интенсивности хемилюминесценции белков после воздействия нагревания при 45°C от времени. Время полужизни радикалов БСА и ГГ составляло около 4 ч при воздействии тепла в диапазоне 35-50°C.

При этом вклад в хемилюминесценцию белка отдельных аминокислот может различаться [1].

Продукция H_2O_2 после 2 ч прогрева при 45°C от концентрации белков имела двухфазную зависимость. В случае ГГ наблюдается двухфазная зависимость образования H_2O_2 после теплового воздействия с четко выраженным максимумом при 1-2 мкМ белка. Для БСА двухфазная зависимость более полого с наибольшим значением при 10 мкМ белка. В обоих случаях через 1 ч после прогрева концентрация H_2O_2 составляла около 40 нМ. Концентрации ГГ – 2 мкМ и БСА – 10 мкМ, которые давали максимальный эффект, были использованы в дальнейшем для измерения содержания H_2O_2 в течение 6 ч после теплового воздействия. В контрольном растворе без белка концентрация H_2O_2 составляла около 4-5 нМ и уменьшалась к 6 ч до 1 нМ. В растворе БСА наблюдалось плавное увеличение

концентрации H_2O_2 в течение 4 ч, а затем быстрое ее уменьшение к 6 ч. В случае ГГ происходил рост ее концентрации до 1 ч с последующим уменьшением к 6 ч. Можно полагать, что в течение времени полужизни ДЖРБ, которое составляет около 4 ч, происходит интенсивная генерация H_2O_2 , приводящая к росту ее концентрации для БСА в течение 4 ч и 1 ч в случае ГГ с последующим распадом.

Максимальная продукция H_2O_2 после 15 мин воздействия гелий-неонового лазерного излучения для БСА и ГГ составила 7 и 2 мкМ соответственно.

В растворах БСА и ГГ после 2 ч нагревания при $45^\circ C$ содержание 7-ОН-кумарин-3-карбоновой кислоты составляло 8 ± 1 нМ для БСА и 15 ± 2 нМ для ГГ ($M \pm m$, $n=3$).

Ранее было установлено, что длительное облучение иммуноглобулинов низкоинтенсивным ближним ультрафиолетовым излучением при 312 нм приводило к генерации H_2O_2 из растворенного кислорода воздуха путем перевода его в синглетное состояние [10]. При этом продукция H_2O_2 происходила преимущественно для ГГ и существенно превышала ее образование для альбуминов и других белков при сопоставлении их эквимольных концентраций. В нашем исследовании при тепловой активации белков такой выраженной способности ГГ генерировать H_2O_2 по сравнению с БСА не наблюдается. Возможно, вывод [10] о специфичности молекул ГГ в этом процессе является некорректным в результате сравнения эквимольных концентраций таких сильно различающихся по массе белков, как БСА и гамма-глобулин. В работе [7] показано, что активация белков при УФ-облучении, сопровождающаяся образованием синглетного кислорода с последующей продукцией H_2O_2 , происходит в результате возбуждения ароматических аминокислот. При этом специфичности в отношении ГГ, по сравнению с БСА, не наблюдается.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что белки сыворотки крови – альбумины и глобулины – способны образовывать ДЖРБ при воздействии лазерного излучения и тепла. Они могут являться компонентами системы антиоксидантной защиты, приводящей к инактивации синглетного кислорода, образующегося при воздействии УФ-излучения [10], видимого света и тепла [2]. Кроме того, ДЖРБ могут играть сигнально-регуляторную роль в процессах, связанных с образованием H_2O_2 [8,9]. Однако необходимо учитывать, что образование АФК под воздействием тепла свыше возможностей их инактивации системами антиоксидантной защиты может приводить к тем же последствиям, что и действие ионизирующей радиации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты 13-04-00730-а и 12-04-31324-мол_а

Список литературы

1. Гудков С.В., Гармаш С.А., Карп О.Э., Смирнова В.С., Черников А.В., Брусков В.И. Долгоживущие радикалы аминокислот, индуцируемые рентгеновским излучением, являются источником образования перекиси водорода в водной среде. // *Биофизика*. – 2010. – Т. 55. - № 4. – С. 588-593.
2. 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.
3. Карп О.Э. , Гудков С.В., Гармаш С.А., Штаркман И.Н., Черников А.В., Брусков В.И. Генотоксическое действие *in vivo* долгоживущих радикалов белка, индуцируемых рентгеновским облучением. // *ДАН*. – 2010. – Т. 434. - № 3. – С. 412-415.
4. Черников А.В., Гудков С.В., Штаркман И.Н., Брусков В.И. Кислородный эффект при тепловых повреждениях ДНК. // *Биофизика*. - 2007. - Т. 52, № 2. - С. 244-251
5. Asadullina N.R., Usacheva A.M., Smirnova V.S., Gudkov S.V. Antioxidative and radiation modulating properties of guanosine-5'-monophosphate. // *Nucleot. Nucleos. and Nucl. Acids*. – 2010. – Vol. 29. – P. 786-799.
6. Bruskov V. I., Malakhova V., Masalimov Z. K., Chernikov A. V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – Vol. 30. – P. 1354-1363.
7. Chin K.K., Trevithick-Sutton C.C., McCallum J, et al. Quantitative determination of singlet oxygen generated by excited state aromatic amino acids, proteins, and immunoglobulins. // *J. Am.Chem. Soc*. – 2008. – Vol. 1340. – P. 6912-6913.
8. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. // *Biochem. J*. – 1997. – Vol. 324. – P. 1–18.
9. Forman H.J., Maiorino M., Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49. – P. 835-842.
10. Wentworth P.J., Jones L.H., Wentworth A.D., Zhu X., Larsen N.A., Wilson I.A., Xu X., Goddard W.A., III, Janda K.D., Es moser A., Leruer R.A. Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science*. – 2001. – Vol. 293. – P. 1806-1811.

Рецензенты:

Брусков В.И., д.х.н., профессор, заведующий лабораторией изотопных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино.

Гудков С.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории изотопных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино.