

ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ ФОРМ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА

Иванов В.Е., Карп О.Э., Попова Н.Р., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И.

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук; 142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

Актуальность. При воздействии ионизирующего излучения в присутствии кислорода активные формы кислорода (АФК), образующиеся в результате радиолиза воды, продуцируют долгоживущие активные формы белков (ДАФБ), которые являются источником вторичной длительной генерации АФК. Изменение содержания перекиси водорода (H_2O_2) под действием различных физических факторов может быть важным элементом лечебного воздействия и адаптации организма к влиянию неблагоприятных факторов среды в результате сигнально-регуляторных процессов. Тепловые воздействия широко используются в медицинской практике для различных лечебных процедур. Однако биологические механизмы их влияния остаются малоисследованными. В связи с этим актуальным является исследование возможности длительной генерации H_2O_2 ДАФБ после воздействия тепла. Это может быть одним из способов активации защитных клеточных механизмов, способствующих преодолению болезни.

Цель – исследование возможности образования ДАФБ белками сыворотки крови – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и гамма-глобулином быка (ГГ) – при умеренной гипертермии и определение существования ДАФБ, индуцированных теплом, и их способности длительно продуцировать генерацию АФК, в частности H_2O_2 .

Материал и методы. Исследование ДАФБ осуществляли методом измерения индуцированной хемилюминесценции растворов белков под действием тепла с использованием высокочувствительного хемилюминометра Биотокс-7АМ. Образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и ГГ под влиянием тепла, измеряли высокочувствительным методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол-р-йодофенол-пероксидаза хрена».

Основные результаты. В данной работе исследована возможность образования ДАФБ белками сыворотки крови – БСА и ГГ – при умеренной гипертермии. Показано, что тепло индуцирует образование ДАФБ, которые, в свою очередь, генерируют АФК (1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2). С помощью метода индуцированной хемилюминесценции продемонстрировано, что в растворах БСА и ГГ, подвергнутых умеренному нагреванию, происходит образование ДАФБ со временем полужизни около четырех часов. Методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол-р-йодофенол-пероксидаза хрена» показана длительная генерация H_2O_2 под действием ДАФБ.

Заключение. Таким образом, обнаружено новое, неизвестное ранее фундаментальное свойство белков сыворотки крови под действием умеренного нагревания образовывать ДАФБ, которые в течение длительного времени продуцируют H_2O_2 . Нельзя исключить, что тепловые воздействия при физиотерапевтических процедурах, которые используются в медицинской практике и сопровождаются образованием активных форм белков и длительной генерацией последними H_2O_2 , могут приводить к сигнально-регуляторному лечебному и адаптивному ответу в организме человека.

Ключевые слова: окисление белков, активные формы кислорода, долгоживущие активные формы белков, перекись водорода, тепловое воздействие.

FORMATION OF LONG-LIVED REACTIVE SPECIES OF BLOOD SERUM PROTEINS BY THE ACTION OF HEAT

Ivanov V.E., Karp O.E., Popova N.R., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Bruskov V.I.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Background: Proteins oxidized by the action of X-rays represent long-lived reactive species, which trigger the secondary generation of reactive oxygen species (ROS). A change in the hydrogen peroxide (H_2O_2) content induced by various physical impacts may be an important factor of the therapeutic effect and the adaptation of the organism to unfavorable environmental conditions. Moderate hyperthermia and a number of physiotherapeutic procedures leading to a local warming of tissues are widely used in medical practice. However, the biological mechanisms of their curative effect are poorly understood. The prolonged generation of H_2O_2 , long-lived reactive protein species (LRPS) after heating may be one of the mechanisms of activation of protective cellular mechanisms and thus to contribute to overcoming the disease.

Aim: To investigate if the serum proteins bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma-globulin (BGG) can form LRPS under moderate hyperthermia and show that heat induces LRPS, which in turn continuously generate ROS, in particular H_2O_2 .

Materials and methods: LRPS were studied by measuring the heat-induced chemiluminescence of protein solutions using a specially elaborated highly sensitive photon-counting chemiluminometer Biotoks-7 AM. The concentration of H_2O_2 formed in heated solutions of BSA and BGG was measured by the method of enhanced chemiluminescence in the system luminol-p-iodophenol-peroxidase.

Results: Here we studied the possibility of formation of long-lived species of the blood serum proteins BSA and BGG in air-saturated solutions under the action of heat. It is shown that heat induces the generation of long-lived protein species, which in turn generate ROS ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2). The formation of the long-lived reactive species of BSA and BGG with a half-life of about 4 h induced by moderate hyperthermia was revealed using the chemiluminescence of protein solutions. It was found that long-lived reactive species of BSA and BGG cause prolonged generation of H_2O_2 .

Conclusion: Thus, we found a new fundamental property of serum proteins: by the action of moderate heating, they are able to transform into LRPS that produce H_2O_2 over a long period of time. Therefore, it cannot be excluded that the heat treatment during physiotherapeutic procedures in clinical practice is accompanied by local heating and the formation of LRPS. H_2O_2 generated by these species may participate in signaling pathways and induce adaptive response in humans.

Key words: protein oxidation, reactive oxygen species, long-lived reactive protein species, hydrogen peroxide, action of heat.

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) в живых организмах возникают как при нормальном клеточном метаболизме, так и при воздействии различных физико-химических факторов. Если уровень АФК превышает возможности нейтрализации антиоксидантной системы клетки, они вызывают окислительный стресс, оказывают повреждающее действие на биомолекулы, запускают разные патологические процессы. Тем не менее при нормальных физиологических условиях АФК в клетке, в первую очередь перекись водорода (H_2O_2), играют сигнально-регуляторную роль в разных биологических процессах как вторичный мессенджер [1, 2]. Последние данные о роли H_2O_2 в клеточной сигнализации млекопитающих представлены в обзорах [1, 2, 3]. Изменение ее содержания под действием различных физических факторов может быть важным элементом лечебного воздействия и адаптации организма к влиянию неблагоприятных факторов среды [2]. В медицинской практике широко применяют умеренную гипертермию и ряд физиотерапевтических процедур, сопровождающихся локальным прогреванием тканей. Однако биологические механизмы их лечебного влияния остаются малоизученными.

Ранее мы показали, что под действием тепла в водных растворах образуются АФК [4, 5, 6, 7]. Есть все основания полагать, что образование H_2O_2 является причиной лечебного воздействия. Высокое содержание в клетках белков делает их второй после воды основной мишенью воздействия АФК. При дей-

ствии высоких доз ионизирующего излучения в присутствии кислорода АФК, образующиеся в результате радиолитического распада воды, продуцируют долгоживущие активные формы белков (ДАФБ), включающие в себя долгоживущие белковые радикалы и гидропероксиды белков [8, 9]. В настоящее время образование долгоживущих белковых радикалов показано для многих белков под действием гамма-, рентгеновского и ультрафиолетового излучений, а также ряда химических соединений [10]. Было установлено, что долгоживущие белковые радикалы вызывают мутации и трансформации клеток [11] и в небольших количествах образуются в клетках животных и растений при нормальной жизнедеятельности [12]. Ранее было показано, что ДАФБ являются источниками вторичных свободных радикалов, которые вызывают дальнейшее окисление биомолекул (белков, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и др.) [8, 9]. Радиационно-индуцированные ДАФБ могут генерировать АФК в течение длительного времени, оказывая генотоксическое действие на ДНК [9, 13], что может быть причиной длительного окислительного стресса после прекращения воздействия ионизирующего излучения. Поскольку тепловое воздействие, как и ионизирующее излучение [4, 5, 6, 7], вызывает продукцию АФК, в данной работе исследовано образование ДАФБ белками сыворотки крови – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и гамма-глобулином быка (ГГ) – при умеренной гипертермии и показаны существование ДАФБ и генерация ими АФК, в частности H_2O_2 .

Иванов Владимир Евгеньевич – мл. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Карп Ольга Эдвиновна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Попова Нелли Рустамовна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Черников Анатолий Викторович** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Гудков Сергей Владимирович** – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Брусков Вадим Иванович** – д-р хим. наук, профессор, зав. лабораторией изотопных исследований ИТЭБ РАН.

Для корреспонденции: Иванов Владимир Евгеньевич – 142290, Московская обл., г. Пушкино, мкр «В», 35-149, Российская Федерация. Тел.: +7 (916) 980 33 79. E-mail: iwe88@rambler.ru

Ivanov Vladimir Evgen'evich – junior scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Karp Olga Edvinovna** – PhD, scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Popova Nelli Rustamovna** – PhD, scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Chernikov Anatoliy Viktorovich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Gudkov Sergey Vladimirovich** – PhD, leading scientific worker, Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS. **Bruskov Vadim Ivanovich** – PhD, Professor, the Head of the Laboratory of Isotopic Investigations, ITEB RAS.

Correspondence to: Ivanov Vladimir Evgen'evich, 149-35 "B", 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 980 33 79. E-mail: iwe88@rambler.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие реактивы и материалы: 4-йодфенол, кумарин-3-карбоновая кислота (ККК), 7-ОН-кумарин-3-карбоновая кислота (7-ОН-ККК), пероксидаза хрена, БСА (Sigma, США) и ГГ (Serva, Германия), натрий фосфорнокислый одно- и двузамещенный (Amresco, США), натрий хлористый (Solvay, Франция), люминол (AppliChem, Германия), H_2O_2 , 99,5% кислород (Протвино, Россия). Все вещества применялись без дополнительной очистки. Свежеперегнанная бидистиллированная вода имела pH 5,8 и проводимость 120 мкСм/м.

Долгоживущие активные формы белков

Исследование ДАФБ осуществляли методом измерения хемилюминесценции растворов белков, индуцированной тепловым воздействием, с использованием высокочувствительного хемилюминометра Биотокс-7АМ (Экон, Россия). После нагревания растворов белков в течение двух часов при температуре 35-50 °С в темноте измеряли величину хемилюминесценции при комнатной температуре в пластиковых полипропиленовых флаконах для жидкостного сцинтилляционного счета объемом 20 мл (Beckman, США) [9, 10, 13].

Определение продукции перекиси водорода

Образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и ГГ под влиянием тепла, измеряли высокочувствительным методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол-р-йодофенол-пероксидаза хрена». В качестве хемилюминометра использовали жидкостный сцинтилляционный счетчик Бета-1 (Украина) для измерения β -излучения, работающий в режиме счета одиночных фотонов (без схемы совпадений), или хемилюминометр Биотокс-7А (Россия) [9].

Определение концентрации гидроксильных радикалов

Для количественного определения концентрации гидроксильных радикалов в растворе использовали специфичный для ОН-радикалов флуоресцентный зонд – кумарин-3-карбоновую кислоту [6, 14, 15]. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия) с $\lambda_{ex}=400$ нм, $\lambda_{em}=450$ нм. Калибровку проводили с помощью коммерческой 7-ОН-ККК.

Определение концентрации растворенного кислорода

Белковые растворы дополнительно насыщали кислородом путем барботирования в течение 15 минут. Концентрацию кислорода в растворе измеряли с помощью оксиметрического электро-

да ДКТП-02.4 на приборе Эксперт-001 (Эконикс-Эксперт, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хемилюминесцентные методы являются наиболее чувствительными для обнаружения и исследования ДАФБ [9, 10, 13]. Повышение температуры от 35 до 40 °С сопровождалось двукратным увеличением интенсивности хемилюминесценции белков, а до 45 °С – трехкратным. При концентрации БСА и ГГ 6,7 мкмоль [16] в фосфатно-солевом растворе (10 ммоль Na_2HPO_4 , 150 ммоль NaCl, pH 7,4) выявлено образование ДАФБ этих белков при нагревании.

Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации БСА и ГГ имела двухфазную колоколообразную форму. При ~15 мкмоль БСА и ~3 мкмоль ГГ хемилюминесценция растворов достигала максимальных значений. Эти концентрации белков использовали для определения времени полужизни ДАФБ по уменьшению величины хемилюминесценции после теплового воздействия. Учитывая молекулярные массы БСА и ГГ (67 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), видно, что максимальное количество люминесцирующих продуктов, образующихся в результате теплового воздействия, в среднем приблизительно одинаково в расчете на единицу массы этих белков. Кроме того, был установлен кислородный эффект, а именно зависимость интенсивности хемилюминесценции белковых растворов от концентрации растворенного кислорода.

Уменьшение интенсивности хемилюминесценции с течением времени после нагревания дает возможность определить время полужизни ДАФБ. Время полужизни радикалов БСА и ГГ составляло около четырех часов при воздействии тепла в диапазоне 35-50 °С.

Затем мы исследовали образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и ГГ под влиянием тепла (два часа, 45 °С). В случае ГГ наблюдается двухфазная зависимость образования H_2O_2 после теплового воздействия с четко выраженным максимумом при 1-2 мкмоль белка. Для БСА двухфазная зависимость более полого с наибольшим значением H_2O_2 при 10 мкмоль белка. В обоих случаях через один час после прогрева концентрация H_2O_2 составляла около 40 нмоль. Концентрации ГГ (2 мкмоль) и БСА (10 мкмоль), при которых наблюдался максимальный эффект, были использованы в дальнейшем для измерения содержания H_2O_2 в течение шести часов после теплового воздействия. В контрольном растворе без белка концентрация H_2O_2 составляла около 4-5 нмоль и уменьшалась к шести часам до

1 нмоль. В растворе БСА наблюдалось плавное увеличение концентрации H_2O_2 в течение четырех часов, а затем ее быстрое уменьшение к шести часам. В случае ГГ происходил рост ее концентрации до одного часа с последующим уменьшением к шести часам. Можно полагать, что в течение времени полужизни ДАФБ, которое составляет около четырех часов, происходит интенсивная генерация H_2O_2 , приводящая к росту ее концентрации для БСА в течение четырех часов и одного часа в случае ГГ с последующим распадом.

С помощью флуоресцентного зонда ККК, продукт гидроксирования которой – 7-ОН-ККК – интенсивно флуоресцирует [6, 9], определяли образование гидроксильных радикалов в растворах БСА и ГГ после двух часов нагревания при 45 °С. Содержание 7-ОН-ККК составляло 9,1 (4,6-13,4) нмоль для БСА и 15,2 (6,5-23,4) нмоль для ГГ (медиана, 95% доверительный интервал, $n=3$).

Таким образом, обнаружено новое, неизвестное ранее фундаментальное свойство белков сыворотки крови под действием умеренного нагревания образовывать ДАФБ, которые в течение длительного времени продуцируют H_2O_2 . Образование ДАФБ, индуцированных теплом, заведомо не должно ограничиваться только белками сыворотки крови, а должно быть присуще по крайней мере подавляющему большинству клеточных белков, как это происходит в случае рентгеновского излучения [9].

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 13-04-00730-а).

Литература

- Stone J.R., Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(3-4):243-70.
- Forman H.J., Maierino M., Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2010;49(5):835-42.
- Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007;26(1):1-14.
- Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода в воде под действием тепла. Доклады РАН 2002;384(6):821-4. [Bruskov V.I., Masalimov Zh.K., Chernikov A.V. Formation of reactive oxygen shapes in water under the influence of heat. *Doklady RAN* 2002;384(6):821-4 (in Russian)].
- Bruskov V.I., Malakhova L.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 Res* 2002;30(6):1354-63.
- Черников А.В., Брусков В.И. Генерация гидроксильных радикалов и других редокс-активных соединений в морской воде под действием тепла. *Биофизика* 2002;47(5):773-81. [Chernikov A.V., Bruskov V.I. Generation of hydroxyl radicals and other redox active compounds in the sea water exposed to heat. *Biofizika* 2002;47(5):773-81 (in Russian)].
- Брусков В.И., Черников А.В., Гудков С.В., Масалимов Ж.К. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла. *Биофизика* 2003;48(6):942-950. [Bruskov V.I., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Masalimov Zh.K. Thermal activation of the reducing properties of seawater anions. *Biofizika* 2003;48(6):942-50 (in Russian)].
- Dean R.T., Gieseg S., Davies M.J. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci* 1993;18(11):437-41.
- Bruskov V.I., Karp O.E., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action. *Free Radic Res* 2012;46(10):1280-90.
- Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Usacheva A.M., Bruskov V.I. Guanosine and inosine (riboxin) eliminate the long-lived protein radicals induced by X-ray radiation. *Dokl Biochem Biophys* 2007;413:50-3.
- Koyama S., Kodama S., Suzuki K., Matsumoto T., Miyazaki T., Watanabe M. Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation. *Mutat Res* 1998;421(1):45-54.
- Miyazaki T., Morikawa A., Kumagai J., Ikehata M., Koana T., Kikuchi S. Long-lived radicals produced by γ -irradiation or vital activity in plants, animals, cells, and protein solution: their observation and inhomogeneous decay dynamics. *Radiat Phys Chem* 2002;65(2):151-7.
- Karp O.E., Gudkov S.V., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Genotoxic effect of long-lived protein radicals in vivo generated by X-ray irradiation. *Dokl Biochem Biophys* 2010;434:250-3.
- Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла. *Биофизика* 2008;53(1):5-13. [Shtarkman I.N., Gudkov S.V., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in aqueous solutions of L-amino acids by the action of X-rays and heat. *Biofizika* 2008;53(1):5-13 (in Russian)].
- Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Smirnova V.S., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. *Radiat Res* 2006;165(5):538-45.
- Wentworth P. Jr., Jones L.H., Wentworth A.D., Zhu X., Larsen N.A., Wilson I.A., Xu X., Goddard W.A. 3rd, Janda K.D., Eschenmoser A., Lerner R.A. Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science* 2001;293(5536):1806-11.