

УДК 57.043 537.5 577

ВЛИЯНИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА НА МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ

¹Иванова И.П., ¹Трофимова С.В., ²Пискарев И.М., ³Ичеткина А.А.,
³Бурхина О.Е., ³Сысоева В.А.

¹ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»,
Н. Новгород, e-mail: ivanova.ip@mail.ru;

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына, Москва;

³ГБОУ ВПО «Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского», Н. Новгород

Целью работы было исследование влияния излучения плазмы искрового разряда на окислительную модификацию растворов триптофана, альбумина, гемоглобина и оценка образования молекулярных продуктов перекисного окисления липидов в липосомах из холестерина, триглицеридов и общих липидов эукариотических клеток. Анализ окислительной модификации белков проводили по флуоресценции триптофана. Окислительную модификацию липидов оценивали по образованию диеновых и триеновых конъюгатов. Исследование проведено на спектрофлуориметре «Флуорат-02 Панорама» (Санкт-Петербург, 2009 г.). Показано, что с увеличением времени воздействия уровень окисления белков возрастает. Не наблюдается накопления уровня первичных и вторичных молекулярных продуктов перекисного окисления липидов. При воздействии излучением плазмы разряда на липосомы из холестерина наблюдается накопление продуктов, поглощающих в области 215 нм. Воздействие разрядом на липосомы из триглицеридов вызывает снижение уровня низкомолекулярных неокисленных продуктов.

Ключевые слова: излучение плазмы искрового разряда, флуоресценция триптофана, липиды, диеновые и триеновые конъюгаты

THE INFLUENCE OF THE SPARK DISCHARGE PLASMA RADIATION ON PROTEIN'S AND LIPID'S MODIFICATION

¹Ivanova I.P., ¹Trofimova S.V., ²Piskaryov I.M., ³Ichetkina A.A.,
³Burkhina O.E., ³Sysoeva V.A.

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, e-mail: ivanova.ip@mail.ru;

²Scientific Research Institute of Nuclear Physics named after D.V. Skobeltsyn, Moscow State University
named after M.V. Lomonosov, Moscow;

³Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod

The study of the effect of plasma spark radiation on the oxidative modification of tryptophan, albumin, hemoglobin solutions, and evaluation of formation of lipid peroxidation molecular products in liposomes of cholesterol, triglycerides and total lipids of eukaryotic cells was the goal of our research. The analysis of the oxidative modification of proteins was carried out by the fluorescence of tryptophan. The oxidative modification of lipids was assessed by the formation of diene and triene conjugates. The researches were realized on the spectrofluorimeters Fluorat-02 Panorama (St. Petersburg, 2009). It was shown that with increasing time of exposure the level of protein oxidation increases. There has been no accumulation of the level of primary and secondary molecular products of lipid peroxidation. The accumulation of the primary and secondary molecular products of lipid peroxidation wasn't observed. However, the influence of plasma spark radiation on liposomes of cholesterol excites accumulation products absorbing in 215 nm. The impact of the discharge on liposomes of triglycerides cause decreasing level of low-molecular not oxidized products.

Keywords: spark discharge plasma radiation, tryptophans fluorescence, lipids, conjugates diene and triene

Бактерицидный и цитотоксический эффекты низкотемпературной газоразрядной плазмы широко представлены в зарубежных научных публикациях последнего десятилетия [9, 6]. В зоне разряда в процессе плазмохимических реакций образуются радикальные продукты, вызывающие биоцидные и другие биомедицинские эффекты [8, 5]. В российских исследованиях 2012 года проведен детальный анализ и рассчитаны концентрации продуктов, образующихся как в газовой, так и в жидкой фазе при генерации излучения плазмы искрового разряда. Доказано образование соединений, содержащих группы CN, NH

и органических соединений, содержащих группы SH, SS. Исследован механизм снижения pH до уровня 2,8–3, показано, что основной вклад в снижение pH раствора дают окислы азота (90%) и органические соединения (10%). Идентифицированы и рассчитаны концентрации радикалов NH_4^+ , NO_2^\bullet , кислотных остатков ($[\text{H}^+]$), окислителей, восстановителей, содержание перекиси водорода и глубина проникновения излучения в жидкость [8].

При обработке электрическим разрядом органических соединений наблюдалось разложение и образование новых органических соединений [7]. Активные частицы,

образующиеся в жидкой и газовой фазе разряда, взаимодействуют с растворёнными веществами в тонком поверхностном слое, а продукты взаимодействия распространяются внутри жидкости или клетки за счёт диффузии и под действием электрического поля, создаваемого током разряда. Оксиды азота и радикальные продукты участвуют во многих метаболических процессах, в частности, таких как апоптоз и пролиферация клеток [2]. Поэтому исследование состояния биомолекул, клеток и организма в целом в ответ на излучение плазмы искрового разряда имеет большое значение для биомедицинских исследований.

Исследования, позволяющие оценить состояние белков и липидов после воздействия излучения плазмы, до настоящего времени не проводились.

Поэтому целью данной работы было исследование влияния излучения плазмы искрового разряда на флуоресценцию растворов аминокислоты триптофана, альбумина и гемоглобина и образование молекулярных продуктов перекисного окисления липидов в липосомах из холестерина, триглицеридов и общих липидов эукариотических клеток.

Материалы и методы исследования

В данной работе излучение низкотемпературной плазмы генерировалось устройством со следующими характеристиками искрового разряда: длительность импульса – 100 мкс, ток 1 кА, напряжение – 11 кВ, энергия, выделяемая в одном импульсе $5,9 \cdot 10^{-2}$ Дж, частота импульса – 10 Гц.

Разряд формировали следующим образом. Импульсный конденсатор (рабочее напряжение 10 кВ) заряжали через балластное сопротивление от источника питания, $U = 11$ кВ. Полярность источника питания не имела значения. Электроды из нержавеющей стали диаметром 2 мм имели суммарную длину не более 15 мм (расстояние между электродами ~3 мм). Пробивное напряжение промежутка составляло 6 кВ. Длительность переднего фронта 50 нс.

При подаче высокого напряжения происходил искровой разряд. При прохождении электрического тока через разрядный промежуток газ нагревается до высокой температуры. В зоне разряда происходят плазмохимические реакции. Горячий плазменный шнур является источником ультрафиолетового (УФ) излучения. В отличие от плазмы, которая контактирует с обрабатываемым объектом только на поверхности, УФ-излучение может проникать внутрь объекта. В случае открытого электрического разряда на объект воздействуют продукты, образующиеся в канале разряда, и УФ-излучение [8].

В экспериментах использовали D-триптофан производства Reanal (Венгрия), альбумин сывороточный бычий производства Biomed-Krakov (Польша), гемоглобин бычий производства Koch-Light Laboratories Ltd (Англия), холестерин производства Panreac (Испания), триглицериды Vital-diagnostics (Россия), общие липиды Vital-diagnostics (Россия).

Готовились растворы D-триптофана 100; 10; 1 мМоль, альбумина 2,5; 0,25; 0,025; 0,0025 г и гемоглобина 70; 7; 0,7; 0,07 мг на 50 мл раствора Хенкса.

Взвесь мультисамельных липосом в растворе Хенкса готовили методом замораживания–оттаивания. Концентрация холестерина, триглицеридов и общих липидов – 10 и 1 мМ/л.

Растворы белков и взвеси липосом объемом 4 мл обрабатывались излучением искрового разряда в течение 30, 60, 300, 600 и 1200 с. Контролем служили растворы без воздействия. Общее количество проведенных исследований – 540.

Окислительную модификацию белков оценивали по флуоресценции триптофана, длина волны возбуждения – 280–300 нм, длина волны регистрации флуоресценции – 350 нм. Изучение окислительной модификации липидов проводили по спектрам поглощения и по накоплению молекулярных продуктов при 215, 235, 245, 275 нм. Исследование проведено на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» (Санкт-Петербург, 2009 г.).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ окислительной модификации холестерина, триглицеридов и общих липидов в ультрафиолетовой области показал, что воздействие излучением плазмы не приводит к накоплению первичных и вторичных молекулярных продуктов окисления липидов. В то же время обработка липосом из холестерина приводит к накоплению продуктов, поглощающих в области 215 нм. Воздействие излучением плазмы разряда на липосомы из триглицеридов вызывает снижение уровня низкомолекулярных неокисленных продуктов при 215 нм.

Одним из основных критериев свободно-радикального окисления является образование в полиненасыщенных жирных кислотах сопряженных (конъюгированных) связей и, соответственно, первичных молекулярных продуктов – диеновых конъюгатов и вторичных продуктов триеновых конъюгатов. Из обзора R. Alan Wheatley [11] известно, что при спектроскопии липидов в области 210–217 нм поглощают низкомолекулярные неокисленные продукты в некоторых случаях с двойными связями, в области 230–238 нм – молекулы транс-, и транс-сопряженные – конъюгированные двойные связи, в области 243–250 нм цис- и транс-конъюгированные двойные связи, в области 274–280 нм – кетоны и диены и их вторичные производные.

Т.к. после воздействия разрядом не накапливаются первичные и вторичные продукты цепного окисления липидов, то можно было бы предположить, что окисление липидов под действием излучения плазмы не происходит. Однако известно, что при генерации искрового разряда накапливается $\text{HO}_2\cdot$ радикал. И перекисное окисление

липидов может быть инициировано радикалами $\text{HO}_2\cdot$; если энергия отрыва атома водорода по С–Н связи заметно меньше или порядка 88 ккал/моль. Энергия связи С–Н для углеводородов и, в частности, для жирных кислот лежит в пределах от 60 до 110 ккал/моль [12, 3]. По данным Богач П.Г. [1], в ненасыщенных жирных кислотах энергия отрыва атома водорода, расположенного в альфа-положении относительно двойной связи, составляет 87 ккал/моль, поэтому отрыв атома водорода в таких соединениях радикалами $\text{HO}_2\cdot$ возможен. Таким образом, радикал $\text{HO}_2\cdot$ может оторвать атом водорода от липида, в котором есть хотя бы одна двойная связь. Энергии фотонов с длиной волны 253,7 нм (поток УФ-фотонов $(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{15} \text{ (см}^2 \cdot \text{с)}^{-1}$ с плотностью энергии $(2 \pm 0,3) \cdot 10^{-3} \text{ Дж (см}^2 \cdot \text{с)}^{-1}$ [8]) в некогерентном излучении плазмы искрового разряда с избытком достаточно для отрыва атома водорода в любом липиде. Однако взаимодействие молекул с фотонами носит резонансный характер. Если в веществе нет пика поглощения для энергии фотона, взаимодействие очень маловероятно. В этом случае инициирование может происходить с участием радикала $\text{HO}_2\cdot$, который будет образовываться при длине волны фотона меньше 260 нм.

Вероятно, именно поэтому после обработки липосом не накапливались продукты первичной деградации липидов, а образовывались или разлагались вещества, которые поглощают активные частицы (радикалы или фотоны). Данные, полученные в нашей работе, согласуются с результатами [5]. В работе исследовалось изменение концентрации диеновых и триеновых конъюгатов, малонового диальдегида и оснований Шиффа в прокариотических клетках под действием излучения искрового разряда. Установлено, что концентрация этих продуктов снижается. Это означает, что под действием излучения происходит разрушение продуктов окисления липидов, причем скорость разрушения соизмерима со скоростью их образования.

Вода, белки и липиды являются основными компонентами клетки. Образование активных радикальных продуктов под действием излучения плазмы искрового разряда в воде рассмотрены в работе [8]. Поэтому во второй части нашей работы мы исследовали уровень окисления растворов триптофана и таких белков, как альбумин и гемоглобин.

Известно, что белки обладают люминесценцией в ультрафиолетовой области спектра. Установлено, что ответственными за ультрафиолетовую люминесценцию белков

являются входящие в их состав ароматические аминокислоты: триптофан, тирозин и малой степени фенилаланин. Триптофан – наиболее интенсивно флуоресцирующая аминокислота в белках. Около 90% всей собственно флуоресценции белков обычно обусловлено триптофановыми остатками [10]. Поскольку триптофан относится к группе аминокислот, в наибольшей степени подверженным свободно-радикальным атакам, то, следовательно, он является достаточно чувствительным маркером окислительного стресса [4].

При оценке окислительной модификации растворов триптофана, альбумина и гемоглобина было показано, что увеличение времени воздействия излучением плазмы искрового разряда приводит к тушению флуоресценции триптофана, т.е. к окислительной деградации белков. После обработки растворов триптофана и гемоглобина флуоресценция снижается в 2–3 раза, а в растворах альбумина – в 6 раз. Таким образом, растворы альбумина в большей степени подвергаются окислительной деградации, чем растворы гемоглобина.

Заключение

Излучение плазмы искрового разряда приводит к деградации липидов и белков увеличением времени воздействия. В липосомах не накапливаются первичные и вторичные молекулярные продукты окисления липидов, однако наблюдается накопление и расходование низкомолекулярных недоокисленных продуктов, поглощающих в коротковолновой области ультрафиолетового спектра. В растворах белков увеличение времени воздействия излучением плазмы искрового разряда приводит к тушению флуоресценции триптофана, т.е. к окислительной модификации белков.

Список литературы

1. Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е. Структура и функция биологических мембран. – Киев: Вища школа, 1981. – 336 с.
2. Ванин А.Ф., Чазов Е.И. Перспективы создания на основе динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами лекарственных средств различного действия // Биофизика. – 2011. – Т. 56(2). – С. 304–315.
3. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Горобец Н.И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. – Киев: Морион, 2004. – 160 с.
4. Giulivi C., Traaseth N.J., Davies K.J.A. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance // Amino acids. – 2003. – Vol. 25. – P. 227–232.
5. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskaryov I.M. The study of biocidal mechanisms of spark discharge plasma radiation // Modern Technologies in Medicine. – 2012. – № 3. – P. 12–18.
6. López García J., Asadinezhad A., Pachernik J., Lehocý M., Junkar I., Humpolíček P., Sába P. and Valášek P. Cell Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified

by Argon Plasma Treatment // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – P. 2845–2856

7. Mazzocchin G.-A., Bontempelli G., Magno F. Glow discharge electrolysis on methanol // *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1973. – Vol. 42, № 2. – P. 243–252.

8. Piskarev I.M., Ivanova I.P., Trofimova S.V., N.A. Aristova Formation of Active Species in Spark Discharge and Their Possible // *High Energy Chemistry*. – 2012. – Vol. 46, № 5. – P. 406–411.

9. Rupf S., Lehmann A., Hannig M., Schafer B., Schubert A., Feldmann U. and Schindler A. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet // *Journal of Medical Microbiology*. – 2010. – Vol. 59. – P. 206–212.

10. Vivian J.T., Callis P.R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins // *Biophys J.* – 2001. – Vol. 80, № 5. – P. 2093–2109.

11. Wheatley R. Alan. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation // *Trends in analytical chemistry*. – 2000. – Vol. 19, № 10. – P. 617–628.

12. Yu-Ran L. Handbook of bond dissociation energies in organic compounds. – London, New York, Washington. CRC Press LLC. Boca Raton, 2003. – 94 p.

References

1. Bogach P.G., Kursky M.D., Kucherenko N.E., Rybalchenko V.K. The structure and function of biological membranes. Kiev., 1981. 336 p.

2. Vanin A.F., Chazov E.I. Prospects of on the basis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands of the various drugs – *Biophysics*, 2011, T. 56 (2), pp. 304–315.

3. Kazimirko V.K., Maltsev V.I., Gorobets N.I. Free radical oxidation and antioxidant therapy. Kiev., 2004. 160 p.

4. Giulivi C., Traaseth N.J., Davies K.J.A. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance – *Amino acids*, 2003, Vol. 25. pp. 227–232.

5. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskaryov I.M., Burkina O.E., Sysoeva V.A., Karpel Vel Leitner N. The study of biocidal mechanisms of spark discharge plasma radiation – *Modern Technologies in Medicine*, 2012, no 3, pp. 12–18.

6. López García J., Asadinezhad A., Pacherník J., Lehotský M., Junkar I., Humpolíček P., Sába P. and Valášek P. Cell Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified by Argon Plasma Treatment – *Molecules*, 2010, Vol. 15, pp. 2845–2856.

7. Mazzocchin G.-A., Bontempelli G., Magno F. Glow discharge electrolysis on methanol – *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1973, Vol. 42, no. 2, pp. 243–252.

8. Piskarev I.M., Ivanova I.P., Trofimova S.V., and N.A. Aristova Formation of Active Species in Spark Discharge and Their Possible – *High Energy Chemistry*, 2012, Vol. 46, no. 5, pp. 406–411.

9. Rupf S., Lehmann A., Hannig M., Schafer B., Schubert A., Feldmann U. and Schindler A. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet – *Journal of Medical Microbiology*, 2010, Vol. 59, pp. 206–212.

10. Vivian J.T., Callis P.R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins – *Biophys J.*, 2001, Vol.80, no 5, pp. 2093–2109.

11. Wheatley R. Alan. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation – *Trends in analytical chemistry*, 2000, Vol.19, no. 10, pp. 617–628.

12. Yu-Ran L. Handbook of bond dissociation energies in organic compounds. London, New York, Washington., 2003. 94 p.

Рецензенты:

Малиновская С.Л., д.б.н., профессор кафедры медицинской физики и информатики ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород;

Обухова Л.М., д.б.н., старший преподаватель кафедры биохимии им. Г.Я. Городисской ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 17.12.2012.