

УДК 544.032.65; 544.4; 577.344; 519.65

КИНЕТИКА СВЕТОКИСЛОРОДНОГО ЭФФЕКТА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ БЕЛКОВ

А. В. Шкирин^{1,2}, Н. В. Суязов¹, С. Н. Чириков²,
В. Е. Иванов³, С. В. Гудков^{1,4}

Рассмотрены молекулярные механизмы участия белков в генерации активных форм кислорода (АФК) в результате синглет-кислородного эффекта, возникающего под действием лазерного излучения в растворах различных белков. Выведены кинетические уравнения, описывающие генерацию АФК, и найдено их приближенное общее решение в аналитическом виде. Путем сопоставления найденных кинетических зависимостей с данными эксперимента определены порядки и константы скорости соответствующих химических реакций. Анализ результатов позволяет считать, что фундаментальные механизмы реакций образования АФК в растворах различных белков одинаковы.

Ключевые слова: белковые растворы, активные формы кислорода, пероксид водорода, светокислородный эффект, кинетические уравнения.

1. *Введение.* Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в аэробных клетках в результате нормального метаболизма [1] и при воздействии внешних факторов среды [2]. Световое воздействие (обычно при использовании лазеров) на биохимические системы, приводящие к образованию АФК, называется в литературе светокислородным эффектом [3]. Актуальность данной темы связана, в частности, с тем, что увеличение внутриклеточной концентрации АФК свыше уровня антиоксидантной защиты вызывает “окислительный стресс”, который сопровождается повреждениями биологических жизненно важных структур, приводя к перекисному окислению липидов,

¹ ИОФ РАН, 119991 Россия, Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: avshkirin@mephi.ru.

² НИЯУ “МИФИ”, 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31.

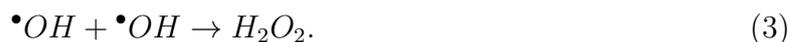
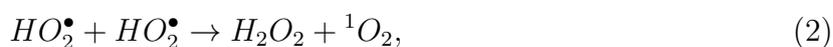
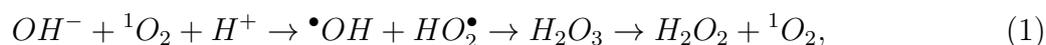
³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Россия, г. Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3.

⁴ МФТИ, 141701 Россия, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, 9.

окислительной модификации нуклеиновых кислот и белков и нарушению процессов, необходимых для жизнедеятельности клеток. Однако установлено, что АФК оказывают не только повреждающее воздействие, но выполняют в организме еще и сигнально-регуляторную роль, связанную с нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза. Это приводит к активации адаптационных и защитных процессов в клетках путем экспрессии генов антиоксидантной защиты, репарации ДНК и др. [4]. Например, в организме млекопитающих небольшое изменение содержания пероксида водорода, вызванное различными физическими воздействиями, может быть основой терапевтических процедур [5].

Целью данной работы было построение кинетической модели образования АФК в водных растворах белков при облучении гелий-неоновым лазером на длине волны 632.8 нм и нахождение значений порядков и констант скоростей соответствующих химических реакций по экспериментально измеренным зависимостям концентрации перекиси водорода от времени и концентрации растворенного белка в водных растворах бычьего гамма-глобулина (БГГ) и бычьего сывороточного альбумина (БСА). Концентрация H_2O_2 определялась по интенсивности хемолюминесценции на приборе "Биотокс-7А" [6].

2. *Синглет-кислородные реакции в водных растворах белков.* Переходы в столкновительных комплексах (димольях) растворенного в воде кислорода в триплетном состоянии ${}^3\Sigma_g^- ({}^3\Sigma_g^- + {}^3\Sigma_g^- \rightarrow {}^1\Delta_g + {}^1\Delta_g)$ с поглощением света на длине волны ~ 630 нм (ширина полосы 18 нм) позволяют использовать излучение гелий-неонового лазера с длиной волны 632.8 нм для генерации кислорода в синглетном состоянии ${}^1\Delta_g$ [3]. При взаимодействии синглетного кислорода с ионами гидроксила и водорода образуются гидроксил, гидроперекисный радикал и пероксид водорода [6]



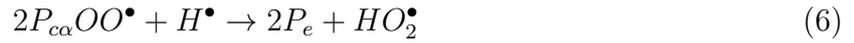
Реакция $\bullet OH$ с атомом водорода при α -углеродном атоме полипептидной цепи в молекуле белка Р приводит к отрыву атома водорода и образованию α -углеродного радикала [7]:



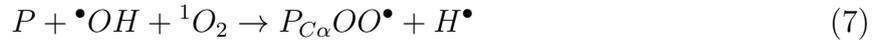
В результате реакции α -углеродного радикала с синглетным кислородом образуется пероксильный радикал белка [8]:



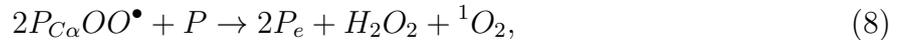
Далее происходит элиминация гидропероксида из пероксирадикала белка



и дополнительное образование пероксида водорода за счет дисмутации гидроперекисных радикалов по реакции (2). Наряду с этим при взаимодействии с синглетным кислородом происходит также модификация ряда боковых аминокислотных остатков [9]. Если суммировать реакции (4) и (5), то получим образование пероксирадикала белка



в результате совместного действия на белок гидроксильных радикалов и синглетного кислорода. Пероксирадикал белка является долгоживущей активной формой белка (ДАФБ). Дальнейшее превращение ДАФБ сопровождается выделением гидропероксида, дисмутация двух молекул которого приводит к образованию пероксида водорода:

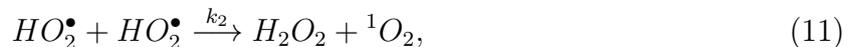


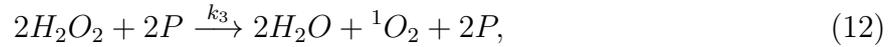
где P_e – конечный продукт превращения ДАФБ из исходного белка. Однако для немонотонной зависимости концентрации пероксида водорода от времени с участием ДАФБ, дополнительно необходима ещё одна реакция разложения его белком:



Описанная ниже кинетическая модель предсказывает существование реакции (9), которая является некаталитической формой каталазной активности всех белков, как это представлено в работе [10].

3. Упрощенная модель химической кинетики. Как следует из раздела 2, кинетика генерации пероксида водорода в эксперименте может быть описана упрощенной минимальной системой химических уравнений:





Реакция (10) описывает процесс образования радикала HO_2^\bullet , который, в свою очередь, приводит к образованию перекиси H_2O_2 в соответствии с (11). В предложенной модели рассматриваются два канала распада перекиси: (12) – распад вследствие каталазной активности белка и (13) – самораспад. Для реакций распада характерно несовпадение экспериментально определяемых порядков этих реакций с формальными стехиометрическими коэффициентами; эти порядки могут быть как целыми, так и дробными [23]. Поэтому кинетические уравнения для концентраций АФК (HO_2^\bullet и H_2O_2), соответствующие приведенной выше системе химических реакций, запишем в общем виде:

$$dHO_2^\bullet/dt = k_1[P] \cdot [{}^1O_2] - 2k_2 \cdot [HO_2^\bullet]^2, \quad (14)$$

$$dH_2O_2/dt = k_2 \cdot [HO_2^\bullet]^2 - 2k_3 \cdot [P]^\gamma \cdot [H_2O_2]^\beta - 2k_4 \cdot [H_2O_2]^\alpha, \quad (15)$$

где k_i ($i = 1 \dots 4$) – константы скоростей соответствующих реакций и α, β, γ – порядки реакций распада перекиси водорода. Значения α, β, γ подлежат определению, исходя из данных эксперимента.

4. Зависимости концентрации перекиси водорода от концентрации белка в водных растворах БСА и БГГ. Применяя условие стационарности промежуточных продуктов к системе (10)–(13), то есть условие равенства прихода и убыли для H_2O_2 и HO_2^\bullet , получаем

$$k_1[P] \cdot [{}^1O_2] = 2k_2 \cdot [HO_2^\bullet]^2, \quad (16)$$

$$k_2 \cdot [HO_2^\bullet]^2 = 2 \cdot k_3 \cdot [P]^\gamma \cdot [H_2O_2]^\beta + 2 \cdot k_4 \cdot [H_2O_2]^\alpha \quad (17)$$

после подстановки (16) в (17) имеем:

$$k_1[P] \cdot [{}^1O_2] = 4 \cdot k_3 \cdot [P]^\gamma \cdot [H_2O_2]^\beta + 4 \cdot k_4 \cdot [H_2O_2]^\alpha. \quad (18)$$

Известно [11, 12], что реакция самораспада перекиси водорода (13) имеет порядок $1 \leq \alpha \leq 2$. Разумно предположить, что реакция разложения перекиси белком (12) описывается, аналогично самораспаду, порядком по перекиси $1 \leq \beta \leq 2$. Порядок реакции

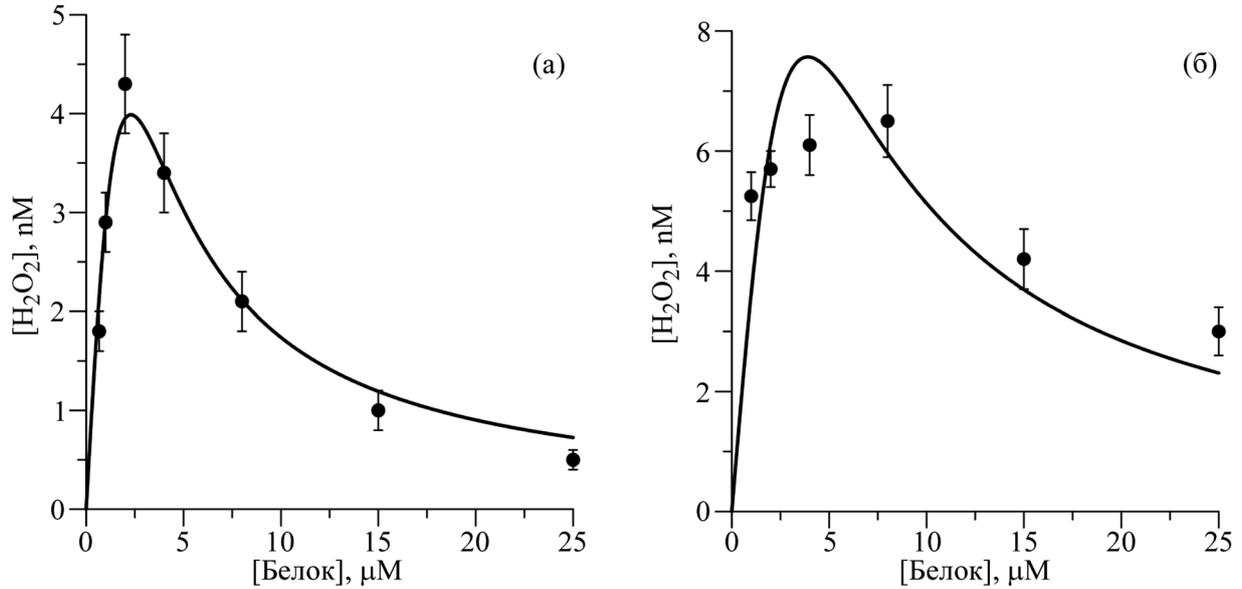


Рис. 1: Концентрация H_2O_2 в зависимости от концентрации белка при воздействии излучения He-Ne лазера (3 мВт) в течение 30 минут на водный раствор: (а) БГГ; (б) БСА. Кружки – экспериментальные значения концентрации H_2O_2 . Сплошные линии – теоретические кривые, полученные аппроксимацией экспериментальных точек методом Левенберга–Марквардта.

(12) по белку заранее нам не известен, однако он не может существенно превышать порядок по перекиси, поэтому имеет смысл искать его в диапазоне $1 \leq \gamma \leq 3$.

Результаты измерений зависимости концентрации H_2O_2 от концентрации БГГ и БСА показаны на рис. 1. Численная оптимизация решения уравнения (18) в соответствии с экспериментальными данными (рис. 1), проведенная на множестве целочисленных значений α, β, γ , дает значения $\gamma = 2, \alpha = 1, \beta = 1$, при которых зависимость концентрации перекиси от концентрации белка имеет вид:

$$[H_2O_2] = \frac{1}{4} \cdot \frac{k_1 \cdot [P] \cdot [^1O_2]}{k_3[P]^2 + k_4}. \quad (19)$$

Эту зависимость можно представить в виде функции

$$y(x) = \frac{x}{ax^2 + b}, \quad a = \frac{4 \cdot k_3}{k_1 \cdot [^1O_2]}; \quad b = \frac{4 \cdot k_4}{k_1 \cdot [^1O_2]}. \quad (20)$$

Коэффициенты (a, b) искались нами путем минимизации функционала отклонений функции (20) от экспериментальных данных методом Левенберга–Марквардта [13–15]; найденные значения (a, b) приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Параметры модельной функции $y(x)$ (20)

Белок	a , л ² ·мкмоль ⁻²	b
БГГ	54.629	287.657
БСА	16.835	259.394

5. Динамика образования перекиси водорода в водных растворах БСА и БГГ. Учитывая найденные в разделе 4 значения порядков реакций $\gamma = 2$, $\alpha = 1$, $\beta = 1$, запишем систему кинетических уравнений (14)–(15) в следующем функциональном виде ($z(t) \equiv [HO_2^\bullet]$, $y(t) \equiv [H_2O_2]$) со свободными коэффициентами (A, B, C) :

$$\frac{d}{dt}z(t) = A - 2Bz(t)^2, \quad \frac{d}{dt}y(t) = Bz(t)^2 - Cy(t), \quad y(0) = y_0, \quad z(0) = z_0. \quad (21)$$

Зависимость от времени $y(t)$ будет иметь максимум при выполнении условия $z_0 > \sqrt{\frac{A}{2B}}$. В этом случае решение системы (21) имеет вид

$$z(t) = \sqrt{\frac{A}{2B}} \coth \left(\sqrt{2BA}t + \operatorname{arccoth} \left(z_0 \sqrt{\frac{2B}{A}} \right) \right), \quad (22)$$

$$y(t) = \frac{A}{2} e^{-Ct} \int_0^t \coth \left(\sqrt{2BA}\tau + \operatorname{arccoth} \left(z_0 \sqrt{\frac{2B}{A}} \right) \right)^2 e^{C\tau} d\tau + y_0 e^{-Ct}. \quad (23)$$

Поиск свободных коэффициентов значительно упрощается, если представить (23) через известные функции. Если заменить функцию $\coth(x)^2$ при $x > 0$ приближенным выражением $\frac{1}{x^2} + 1 - \frac{1}{3}e^{3/2x} - \frac{x}{2}e^{53/60x}$ (относительная ошибка не более $1.3 \cdot 10^{-2}$), интеграл в (23) сводится к табличным интегралам.

Экспериментальные зависимости концентрации пероксида водорода от времени в растворах БГГ и БСА с концентрациями 2 μ М и 10 μ М, соответствующими приблизительно максимумам графиков на рис. 1(а) и рис. 1(б), при воздействии лазерного излучения, а также результаты их аппроксимации методом Левенберга–Марквардта на основе решения (23) показаны на рис. 2.

Найденные значения параметров функций (22) и (23) в единицах, указанных на графиках (рис. 2), приведены в табл. 2. Здесь $\xi = \sqrt{2AB}$, $\eta_0 = \operatorname{arccoth}(z_0 \sqrt{2B/A})$.

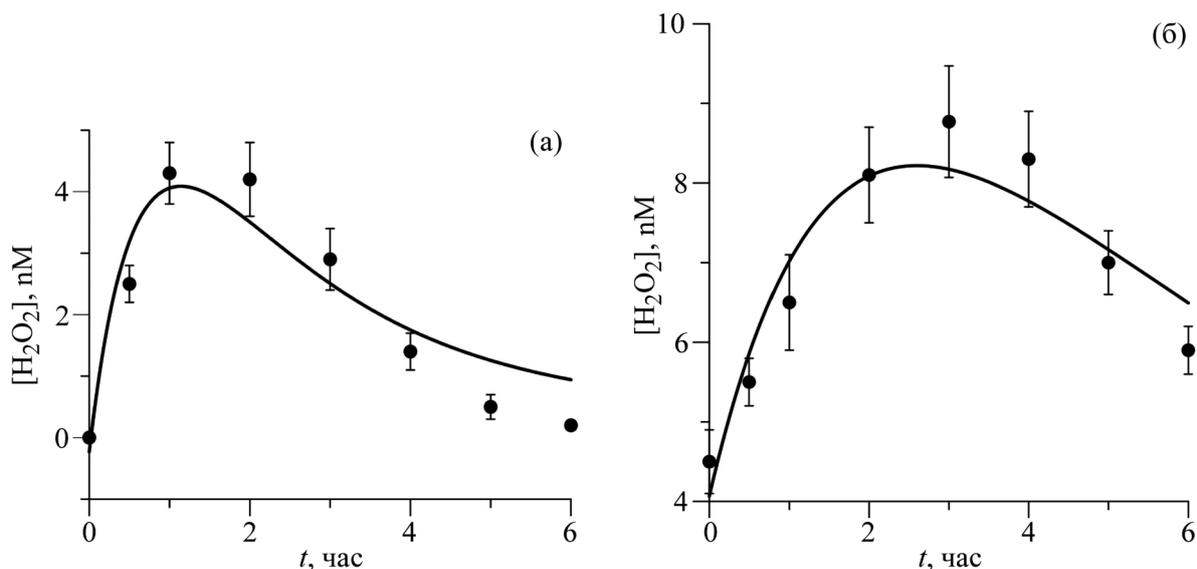


Рис. 2: Динамика образования пероксида водорода при воздействии излучением He-Ne лазера мощностью 3 мВт (15 мин) на растворы белков в фосфатном буфере (10 mM Na_2HPO_4 и 150 mM $NaCl$, pH 7.4): (а) БГГ (2 μ M); (б) БСА (10 μ M). Кружки – экспериментальные значения концентрации H_2O_2 . Сплошные линии – теоретические кривые, полученные аппроксимацией экспериментальных точек методом Левенберга–Марквардта.

б. Химические константы. Константы скоростей реакций (10)–(13) связаны с параметрами функций (20) и (23), описывающих процесс генерации пероксида водорода, соотношениями:

$$2(k_4 + k_3[P]^2) = C; k_3 = \frac{a}{b}k_4; k_2 = B = \frac{\xi^2}{2A}; k_1^{(eff)} = k_1 \cdot [^1O_2] = \frac{4 \cdot k_4}{b}. \quad (24)$$

Оценки констант скоростей реакций k_1, k_2, k_3, k_4 , сделанные согласно (27) при известных заданных концентрациях БГГ и БСА в кинетических экспериментах ($[P] = 2$ и 10 мкмоль/л, соответственно), приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 2

Параметры модельной функции $y(t)$ (23)

Белок	ξ , час ⁻¹	η_0	C , час ⁻¹	y_0 , нмоль·л ⁻¹	A , нмоль·час ⁻¹
БГГ	0.096	0.148	0.939	0.00023	$4.86 \cdot 10^{-4}$
БСА	0.044	0.295	0.396	0.00041	$9.77 \cdot 10^{-4}$

Т а б л и ц а 3

Кинетические константы (27)

Белок	$k_1^{(\text{eff})}$, с^{-1}	k_2 , $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$	k_3 , $\text{л}^2\cdot\text{моль}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$	k_4 , с^{-1}
БГГ	$1.0 \cdot 10^{-6}$	$2.6 \cdot 10^6$	$1.4 \cdot 10^7$	$7.4 \cdot 10^{-5}$
БСА	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$2.8 \cdot 10^5$	$4.8 \cdot 10^5$	$7.3 \cdot 10^{-6}$

Отметим, что найденные значения k_4 по порядку величины согласуются с интерполированными данными по температурному распаду пероксида водорода [12].

7. *Заключение.* В работе была исследована кинетика образования АФК в водных растворах под действием лазерного излучения. Исходя из закономерностей фотохимических процессов, приводящих к трансформации ДАФБ, была определена минимальная система химических реакций и выведены кинетические уравнения. На основе приближенного аналитического решения кинетических уравнений и данных измерений концентрации H_2O_2 в различных условиях с использованием алгоритма Левенберга–Марквардта оценены значения кинетических констант, описывающих светокислородный эффект в растворах БСА и БГГ. Подобие функциональных зависимостей концентрации H_2O_2 от содержания белка и времени позволяет заключить, что фундаментальные механизмы химических реакций, ведущих к образованию H_2O_2 в растворах белков, одинаковы. Это означает, что аналогичные подходы применимы и к другим классам физических воздействий на белковые растворы. Таким образом, представленные в работе подходы и решения могут быть использованы для исследования генерации АФК в различных белковых системах, в том числе и максимально приближенных к живым системам.

Работа выполнена при поддержке Программы повышения конкурентоспособности НИЯУ МИФИ, программы “Физические методы в сельском хозяйстве и экологии” (№ 0024–2019–0004) и гранта РФФИ № 20–34–70037.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] A. V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva, O. L. Kardymon, et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 6175804 (2019); doi: 10.1155/2019/6175804.
- [2] S. V. Gudkov, M. A. Grinberg, V. Sukhov, et al., *J. Environ. Radioact.* **202**, 8 (2019); doi: 10.1016/j.jenvrad.2019.02.001.

- [3] С. Д. Захаров, А. В. Иванов, Квантовая электроника **29**(3), 192 (1999); doi: <https://doi.org/10.1070/QE1999v029n12ABEH001629>.
- [4] M. G. Sharapov and V. I. Novoselov, Biochemistry (Mosc). **84**(2), 79 (2019); doi: [10.1134/S0320972519020015](https://doi.org/10.1134/S0320972519020015).
- [5] M. M. Borisova-Mubarakshina, D. V. Vetoshkina, and B. N. Ivanov, Physiol. Plant. **166**(1), 181 (2019); doi: [10.1111/pp1.12936](https://doi.org/10.1111/pp1.12936).
- [6] V. E. Ivanov, O. E. Karp, V. I. Bruskov, et al., Indian J. Biochem. Biophys. **56**, 214 (2019).
- [7] M. J. Davies, Biochim. Biophys. Acta **1703**, 93 (2005); doi: [10.1016/j.bbapap.2004.08.007](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007).
- [8] С. Д. Захаров, А. В. Иванов, Е. Б. Вольф и др., Квантовая электроника **33**(2), 149 (2003); doi: <https://doi.org/10.1070/QE2003v033n02ABEH002376>.
- [9] M. J. Davies, Photochem. Photobiol. Sci. **3**, 17 (2004).
- [10] C. L. Hawkins and M. J. Davies, Biochim. Biophys. Acta **1504**, 196 (2001); doi: [10.1016/s0005-2728\(00\)00252-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00252-8).
- [11] Г. М. Панченков, В. Л. Лебедев, Химическая кинетика и катализ (М., "Химия", 1985).
- [12] J. Takagi and K. Ishigure, Nuclear Science and Engineering **89**, 177 (1985); doi: <https://doi.org/10.13182/NSE85-A18191>.
- [13] K. Levenberg, Quart. Appl. Math. **2**, 164 (1944); doi: <https://doi.org/10.1090/qam/10666>.
- [14] D. Marquardt, SIAM J. Appl. Math. **11**, 431 (1963); doi: [http://dx.doi.org/10.1137/0111030](https://dx.doi.org/10.1137/0111030).
- [15] J. Nocedal and S. J. Wright, *Numerical Optimization* (New York, Springer, 1999).

Поступила в редакцию 5 ноября 2019 г.

После доработки 10 декабря 2019 г.

Принята к публикации 3 февраля 2020 г.