

## ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА В РАСТВОРАХ ЖЕЛАТИНА И КАЗЕИНА

© 2018 г. В.Е. Иванов\*, А.В. Черников\*, С.В. Гудков\*\* \*\*\* \*\*\*\*, В.И. Брусков\*

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, г. Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

\*\*Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского,  
129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2

\*\*\*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

\*\*\*\*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

E-mail: bruskov\_vi@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.06.18 г.

Методом хемилюминесценции белковых растворов показано образование долгоживущих активных форм желатина, казеина и гидролизата казеина с периодом полураспада около 4 ч, вызванных умеренной гипертермией. Установлено, что долгоживущие активные формы данных белков и гидролизата казеина вызывают длительную генерацию  $H_2O_2$ , рассмотрен механизм этого процесса. Предполагается, что повышение температуры у теплокровных организмов при различных заболеваниях сопровождается образованием долгоживущих активных форм различных белков, а генерация ими активных форм кислорода является одним из механизмов активации защитных клеточных механизмов, способствующих преодолению болезни.

*Ключевые слова:* активные формы кислорода, долгоживущие активные формы белков, пероксид водорода, гипертермия, казеин, желатин.

**DOI:** 10.1134/S0006302918050058

Активные формы кислорода (АФК) непрерывно образуются в живых клетках как продукты нормального метаболизма. АФК также продуцируются в аэробных организмах под влиянием разных внешних физических факторов, таких как ионизирующее и ультрафиолетовое излучения, излучения сверхвысоких и крайне высоких частот, тепловое воздействие и т.д. [1–5]. Однако установлено, что АФК выполняют еще и сигнальную роль, связанную с нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза. При его нарушении, когда содержание АФК преобладает над возможностью удаления их избыточного количества с помощью антиоксидантной защиты клеток, возникает окислительный стресс [6], который является причиной повреждения биологических молекул и процессов и приводит к различным патологическим последствиям в организме [7]. Из всех АФК в организме млекопитающих основным

вторичным мессенджером является пероксид водорода [8–10].

В настоящее время в медицинской практике обширно используют различные методы и способы гипертермии при лечении больных с онкологическими и другими заболеваниями [11]. Тем не менее молекулярные механизмы применения гипертермии при лечении различных патологий остаются недостаточно выясненными и малоисследованными [12].

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что умеренный нагрев водных растворов в присутствии растворенного кислорода воздуха вызывает образование АФК (синглетного кислорода, супероксид-аниона, гидроксильных радикалов и пероксида водорода) [13–20] в результате комплекса цепных радикальных реакций. Можно полагать, что пероксид водорода, образующийся при воздействии тепла на белки, участвует в активации клеточных механизмов, что может быть причиной лечебного действия гипертермии и является способом борьбы с инфекционными болезнями путем повышения температуры у теплокровных животных и человека. Белки из-за своей распространенности

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ДАФБ – долгоживущие активные формы белков, ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

и высокой реакционной способности к окислению являются основными и наиболее уязвимыми мишенями для АФК по сравнению с липидами, ДНК и другими компонентами биологических систем [21–28]. Нами ранее было показано, что в растворах бычьего сывороточного альбумина и гамма-глобулина под действием тепла происходит образование долгоживущих активных форм белков (ДАФБ), которые, в свою очередь, генерируют АФК, и были рассмотрены молекулярные механизмы этого процесса [29,30]. Полученные данные позволяют предполагать, что это новое фундаментальное свойство всех белков и пептидов. В данной работе исследована способность таких белков, как желатин, казеин и гидролизат казеина, образовывать долгоживущие активные формы этих соединений при умеренной гипертермии и показано, что эти формы способны продуцировать АФК, в том числе их долгоживущую форму – пероксид водорода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были использованы следующие материалы и реактивы: 4-йодфенол, желатин, пероксидаза хрена, супероксиддисмутаза, тирон, казеин и гидролизат казеина (все – Sigma, США); хлорид натрия (Solvey, Франция); моно- и двухосновной фосфат натрия (Amresco, США); люминол (AppliChem, Германия); пероксид водорода и азид натрия («Химмед», Россия); 99,9% D<sub>2</sub>O («Изотоп», Россия). Все реагенты были использованы без дополнительной очистки. Свежеперегнанная бидистиллированная вода имела pH 5,8 и проводимость 120 мкСм/м. Для изменения концентрации кислорода в растворе были использованы 99,5%-й кислород и 99%-й аргон («ГазКом», Россия). Барботирование газов проводили с использованием водной ловушки для удаления посторонних веществ в виде частиц.

**Долгоживущие активные формы белков.** ДАФБ изучали путем измерения индуцированной теплом хемилюминесценции белковых растворов с использованием специально разработанного высокочувствительного хемилюминометра Biotoks-7 ультра («Есон», Россия). После нагревания все образцы выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем измерения проводили в темноте при комнатной температуре в пластиковых полипропиленовых флаконах для жидкостного сцинтилляционного счетчика объемом 20 мл (Beckman, США) [31–33].

**Определение пероксида водорода.** Концентрацию пероксида водорода, образующегося в нагретых растворах желатина, казеина и гид-

ролизата казеина, измеряли методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол–4-йодфенол–пероксидаза» [13–19]. Жидкостный сцинтилляционный счетчик Бета-1 (MedApparatura, Украина) для измерения бета-излучения, работающий в режиме счета одиночных фотонов (без схемы совпадения), служил в качестве хемилюминометра. Высокая чувствительность метода позволяет регистрировать пероксид водорода в концентрации менее 1 нМ. Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли с использованием калибровочных графиков зависимости хемилюминесценции от известной концентрации пероксида водорода в растворе. Начальную концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, которую использовали для калибровки, определяли спектрофотометрически при 240 нм с использованием коэффициента молярного поглощения 43,6 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

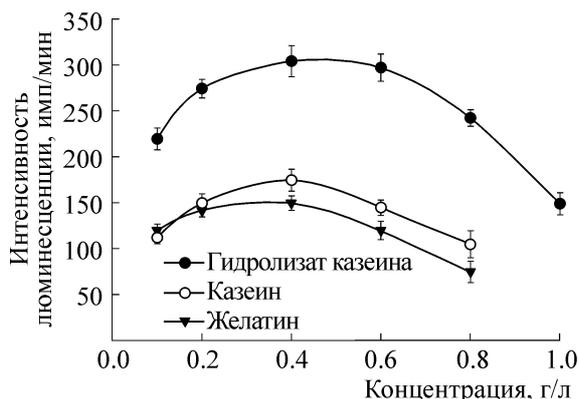
**Определение концентрации растворенного кислорода.** Белковые растворы дополнительно насыщали аргоном или кислородом путем барботирования в течение 15 мин. Концентрацию кислорода в растворе измеряли с помощью электрода ДКТР-02.4 на оксиметре «Эксперт-001» («Эконикс-Эксперт», Россия).

**Статистический анализ.** Результаты представлены как средние величины и их стандартные ошибки. Данные были подвергнуты одностороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с последующим применением критерия Фишера. Различия считались достоверными при  $P < 0,05$ .

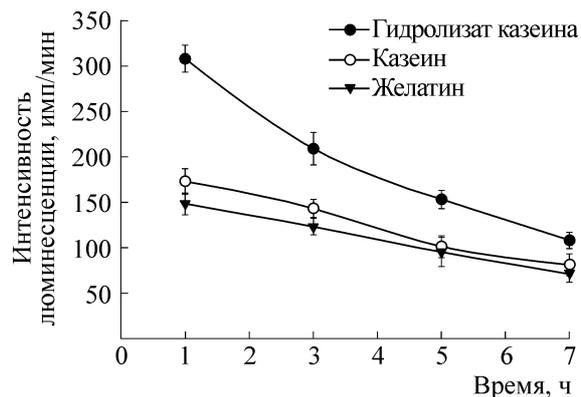
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Хемилюминесценция является удобным методом для обнаружения и исследования ДАФБ [31–33]. График зависимости интенсивности люминесценции от концентрации белков имеет двухфазную форму (рис. 1). Люминесценция растворов максимальна при концентрации 0,4 г/л как для желатина и казеина, так и для гидролизата казеина. Эти концентрации были использованы для определения периода полураспада ДАФБ.

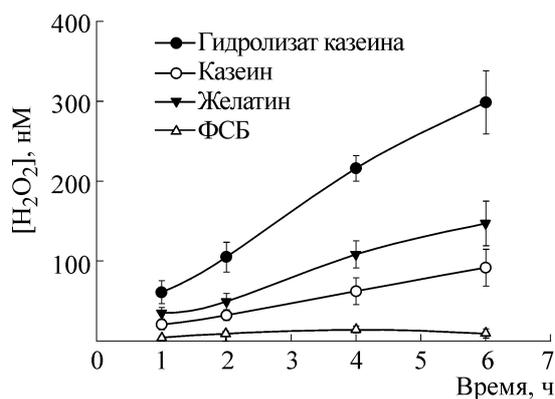
Нагревание белковых растворов при концентрации 0,4 г/л в течение 2 ч при 45°C в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 150 мМ NaCl, pH 7,4, приводило к образованию ДАФБ (рис. 2). Уменьшение интенсивности хемилюминесценции со временем после теплового воздействия позволяет определить период полужизни ДАФБ. Период полужизни окисленных форм данных белков составил около 4 ч после нагревания. Таким образом, показано, что умеренная гипертермия приводит к образованию



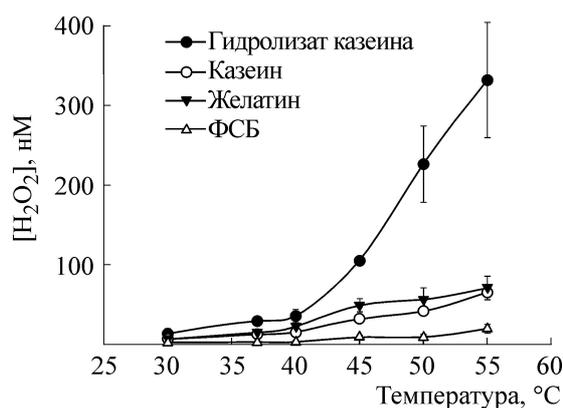
**Рис. 1.** Зависимости интенсивности люминесценции растворов белков и гидролизата казеина, подвергнутых воздействию тепла (45°C, 2ч), от их концентрации. Приведены средние значения и их стандартные ошибки,  $n = 3$ . Образцы после нагревания охлаждали до комнатной температуры. Измерения проводили через 1 ч после воздействия тепла. Из результатов были вычтены значения фоновой люминесценции.



**Рис. 2.** Зависимости интенсивности люминесценции растворов белков и гидролизата казеина, подвергнутых воздействию тепла (45°C, 2ч), от времени после нагревания. Приведены средние значения и их стандартные ошибки,  $n = 3$ . Образцы после нагревания охлаждали до комнатной температуры. Измерения проводили через 1 ч после воздействия тепла. Из результатов были вычтены значения фоновой люминесценции.



**Рис. 3.** Образование пероксида водорода в растворах белков и гидролизата казеина (0,4 г/л) в ФСБ, подвергнутых воздействию тепла (45°C, 1, 2, 4 и 6 ч соответственно). Приведены средние значения и их стандартные ошибки,  $n = 4$ . Образцы после нагревания охлаждали до комнатной температуры. Измерения проводили через 1 ч после воздействия тепла.



**Рис. 4.** Образование пероксида водорода в растворах белков и гидролизата казеина (0,4 г/л) в ФСБ, подвергнутых воздействию тепла (30–55°C, 2 ч). Приведены средние значения и их стандартные ошибки,  $n = 3$ . Образцы после нагревания охлаждали до комнатной температуры. Измерения проводили через 1 ч после воздействия тепла.

ДАФБ вследствие окисления белков и что этот эффект существенно выше у гидролизата казеина.

Далее была исследована зависимость образования  $H_2O_2$  от времени воздействия (45°C, в течение 1, 2, 4 и 6 ч). Как показано на рис. 3, с увеличением времени нагревания происходит усиление генерации пероксида водорода. Максимальная концентрация  $H_2O_2$  наблюдалась при времени нагрева 6 ч и составляла для раствора казеина – 90 нМ, желатина – 150 нМ и гидролизата казеина – 300 нМ, в контрольном ФСБ она составляла около 10 нМ. Скорость

образования пероксида водорода в растворе гидролизата казеина – около 49,9 нМ/ч, желатина – 24,6 нМ/ч, казеина – 15,3 нМ/мин. Зависимости образования  $H_2O_2$  от времени воздействия тепла близки к линейным.

Зависимость образования  $H_2O_2$  от температуры воздействия (30–55°C, 2 ч) представлена на рис. 4. С увеличением температуры нагревания происходит усиление продукции пероксида водорода в данных белковых растворах, особенно ярко выраженное для гидролизата казеина при температуре свыше 40°C. В интервале температур от 30 до 55°C при воздействии

Влияние различных веществ на образование пероксида водорода под действием тепла (45°C, 2 ч) в растворах казеина и его гидролизата

Воздействие	[O <sub>2</sub> ], мкМ	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], нМ		K	
		Казеин	Гидролизат казеина	Казеин	Гидролизат казеина
Контроль	270	32,1 ± 1,4	104,9 ± 3,4	1	1
O <sub>2</sub> **	420	51,6 ± 2,6*	168,0 ± 4,5*	1,61	1,6
Ar**	130	19,8 ± 0,9*	63,8 ± 2,2*	0,62	0,61
D <sub>2</sub> O (25%)	270	38,4 ± 1,3*	127,6 ± 3,1*	1,2	1,22
NaN <sub>3</sub> (0,1мМ)***	270	22,8 ± 0,8*	68,9 ± 3,0*	0,71	0,66
Супероксиддисмутаза (10 <sup>-3</sup> ед./мл)	270	39,9 ± 2,5*	127,3 ± 2,7*	1,24	1,21
Тирон (100 нМ)	270	25,7 ± 1,3*	80,5 ± 2,6*	0,8	0,77
Пероксиредоксин 2 (10 <sup>-2</sup> ед./мл)	270	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*		

Примечание. K – относительное изменение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> под влиянием изучаемого агента; \* – достоверно отличается относительно контроля ( $P < 0,05$ ); \*\* – растворы насыщались в течение 15 мин газом путем барботирования перед нагреванием; \*\*\* – указанной концентрации азид натрия не оказывал заметного ингибирующего влияния на активность пероксидазы. Приведены средние значения трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки

в течение 2 ч для раствора гидролизата казеина концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> увеличилась более чем в 24 раза, для казеина и желатина – примерно в 10–11 раз, для ФСБ – примерно в 8 раз.

Для определения механизма образования пероксида водорода при гипертермии в растворах казеина и его гидролизата изучено влияние на этот процесс различных факторов (таблица). Установлен кислородный эффект – влияние концентрации растворенного кислорода на образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> под действием ДАФБ. Концентрация пероксида водорода, генерируемого ДАФБ, в растворе, дополнительно насыщенном кислородом в течение 15 мин до начала облучения, в 1,6 раза выше как для раствора казеина, так и его гидролизата. При насыщении аргоном под действием тепла в данных белковых растворах образуется примерно на 40% меньше H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, чем в контроле. Эти величины показывают, что изменение образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приблизительно пропорционально содержанию кислорода. Известно, что в присутствии D<sub>2</sub>O увеличивается время жизни синглетного кислорода [34]. Показано, что в присутствии 25% D<sub>2</sub>O концентрация пероксида водорода увеличивается примерно в 1,2 раза. Азид натрия, тушитель синглетного кислорода, уменьшает ДАФБ-индуцированную генерацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 29% для раствора казеина и на 34% – для гидролизата казеина. Эти данные указывают на то, что в образовании пероксида водорода участвует синглетный кислород. Использование супероксиддисмутаза показало, что супероксид анион-радикалы также принимают участие в генерации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в данных белковых растворах под

действием ДАФБ. Супероксиддисмутаза увеличила концентрацию пероксида водорода на 20% за счет дополнительной дисмутации гидроперекисных радикалов. Добавление тирона, спиновой ловушки супероксидных радикалов, снизило концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для раствора казеина и его гидролизата примерно на 20 и 23% соответственно.

Концентрации белков, которые соответствуют максимальной генерации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,4 г/л), были дополнительно использованы для измерения содержания пероксида водорода в течение 23 ч после нагревания (45°C, 2 ч) (рис. 5). В контрольном ФСБ (без белка) концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> составляла около 10 нМ и уменьшалась к 23 ч до ~2,5 нМ. В растворе казеина наблюдалось плавное увеличение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 3 ч ~ до 33 нМ, а затем медленное ее уменьшение к 23 ч в два раза до ~16 нМ. В случае гидролизата казеина происходил рост концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 2 ч (~116 нМ) с последующим снижением к 23 ч приблизительно в два раза до ~64 нМ. Можно полагать, что в течение времени полужизни ДАФБ (около 3–4 ч) происходит интенсивная генерация пероксида водорода, приводящая к росту его концентрации (для казеина в течение 3 ч, а для его гидролизата – 2 ч) с последующим распадом H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Временная зависимость образования пероксида водорода в растворе желатина существенно иная. Скорее всего, это связано с тем, что желатин – частично гидролизованный коллаген, который относится к фибриллярным белкам. Этот результат заслуживает дальнейшего более детального исследования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из таблицы 1 и данных по генерации ОН-радикалов, представленных в работах [29,30,35], в ДАФБ-индуцированной генерации пероксида водорода участвуют  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$  и  $\bullet\text{OH}$ . Принимая во внимание образование АФК в воде под воздействием тепла [13–20], можно предложить следующую последовательность сопряженных реакций, приводящих к образованию ДАФБ и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в белковых растворах:

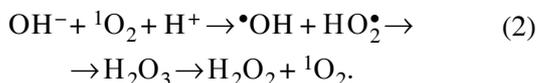


где  $kT$  – воздействие тепла [36,37].

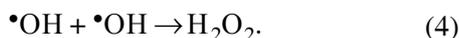
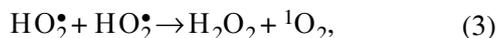
Следует отметить, что тепло с физической точки зрения представляет собой электромагнитное излучение в широком диапазоне спектра, описываемое формулой Планка для спектральной способности абсолютно черного тела [38].

В этом спектре присутствуют частоты, соответствующие возбуждению кислорода с переходом его из триплетного в синглетное состояние, в частности, в инфракрасной области спектра – частота 1270 нм, соответствующая максимуму поглощения молекулярного кислорода [39].

Далее синглетный кислород приводит к образованию продуктов описываемых реакцией (2):

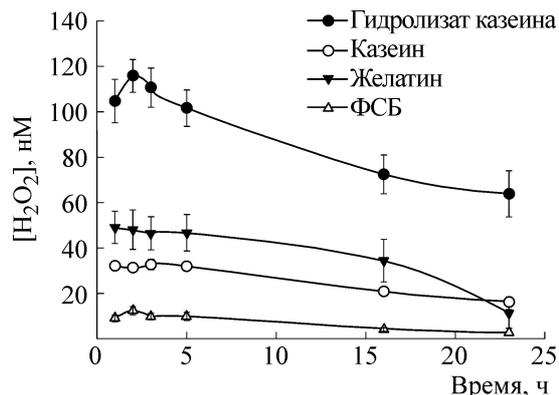
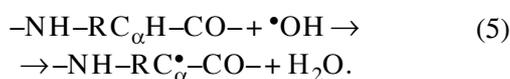


Существование триоксида водорода  $\text{H}_2\text{O}_3$  (реакция 2) как эффективной короткоживущей вариации АФК доказано рядом методов [40]. Два других пути образования пероксида водорода отражены в реакциях (3) и (4):



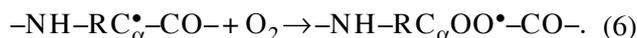
Образование гидроксильных радикалов и пероксида водорода установлено ранее в работах [13–16].

Реакция  $\bullet\text{OH}$  с атомом водорода при  $\alpha$ -углеродном атоме полипептидной цепи приводит к его отрыву и образованию  $\alpha$ -углеродного радикала [41–43]:

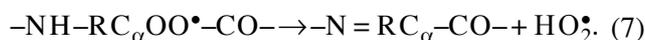


**Рис. 5.** Временная зависимость образования пероксида водорода в растворах белков и гидролизата казеина (0,4 г/л) в ФСБ, подвергнутых воздействию тепла (45°C, 2 ч). Приведены средние значения и их стандартные ошибки,  $n = 3-6$ . Образцы после нагревания охлаждали до комнатной температуры. Измерения проводили через 1 ч после воздействия тепла.

Реакция с кислородом приводит к образованию пероксильного радикала в белках [41, 43]:



Далее происходит элиминация гидропероксида:



В работах [44,45] было показано, что антитела способны катализировать дополнительную реакцию преобразования синглетного кислорода в воду с образованием пероксида водорода через триоксид водорода в качестве ключевого промежуточного звена. В настоящей работе экспериментально подтверждено участие синглетного кислорода и супероксидных (гидропероксидных) радикалов в образовании пероксида водорода. Известно, что  $\alpha$ -углеродный радикал образуется и при отрыве протона также и от боковых остатков  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -групп аминокислот в результате переноса радикального продукта на  $\alpha$ -углерод в белках благодаря повышенной стабильности  $\alpha$ -углеродного радикала в результате делокализации электрона [41,43].

В данной работе впервые показано, что желатин, казеин и гидролизат казеина под действием тепла в присутствии растворенного кислорода воздуха трансформируются в ДАФБ (рис. 1 и 2), которые затем производят  $\text{H}_2\text{O}_2$  в течение длительного периода времени (рис. 3–5), в результате сопряженных электрон-радикальных цепных автокаталитических реак-

ций [32]. Таким образом, показано, что образование индуцированных теплом ДАФБ не ограничивается только белками сыворотки крови [29], но и присуще другим белкам и даже пептидам, как это происходит в случае рентгеновского излучения [32].

Может сложиться впечатление, что концентрация  $H_2O_2$ , продуцируемая активными формами белков в наших экспериментах *in vitro*, слишком мала, чтобы оказывать заметное биологическое действие. Однако следует подчеркнуть, что нами регистрируется средняя концентрация пероксида водорода в сильно разбавленных растворах, а его локальная концентрация вблизи поверхности белка может быть существенно выше. Концентрация пероксида водорода, содержащегося в сыворотке крови, не превышает величину в 250 нМ [22]. Поэтому нельзя исключать, что методы теплового воздействия, использующиеся в медицинской практике, приводят к образованию активных форм белков, которые в свою очередь длительно генерируют пероксид водорода. Это может приводить к сигнально-регуляторному лечебному и адаптивному ответу в организме человека [8, 9]. Более того, можно полагать, что повышение температуры у теплокровных организмов при различных заболеваниях, сопровождающееся образованием активных форм различных белков и длительной генерацией ими  $H_2O_2$ , является одним из механизмов активации защитных клеточных механизмов, способствующих преодолению болезни.

Вместе с тем следует принимать во внимание, что длительное образование АФК под действием тепла свыше возможностей их устранения антиоксидантными системами может приводить к тем же последствиям, что и воздействие ионизирующей радиации.

Работа выполнена по Государственному заданию № 007-00-94-18-00 для ИТЭБ РАН, а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-44-500476 p\_a) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-4521.2018.8). Работы по исследованию люминесценции поддержаны НИР (АААА-А18-118021390190-1).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Einor, A. Bonisoli-Alquati, D. Costantini, et al., *Sci. Total Environ.* **548-549**, 463 (2016).
2. S. Tharmalingam, S. Sreetharan, A. V. Kulesza, et al., *Radiat. Res.* **188** (4.2), 525 (2017).
3. B.-M. Kim, J.-S. Rhee, K.-W. Lee, et al., *Comp. Biochem. Physiol. C*, **167**, 15 (2015).
4. H. Wang and X. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2175 (2017).
5. Z. Wang, F. Cai, X. Chen, et al., *PLoS One*, **8** (9), e75044 (2013).
6. V. I. Lushchak, *Chem. Biol. Interact.* **224**, 164 (2014).
7. M. Schieber and N. S. Chandel, *Curr. Biol.* **24** (10), R453 (2014).
8. J. R. Stone and S. Yang, *Antioxid. Redox Signaling* **8**, 243 (2006).
9. H. J. Forman, M. Maiorino, and F. Ursini, *Biochemistry* **49**, 835 (2010).
10. E. A. Veal, A. M. Day, and B. A. Morgan, *Mol. Cell* **26**, 1 (2007).
11. R. W. Habash, D. Krewski, R. Bansal, and H. T. Alhafid, *Front. Biosci. (Elite Ed.)* **3**, 1169 (2011).
12. X. Gao and H. Chen, *Front. Med.* **8**, 1 (2014).
13. В. И. Брусков, Ж. К. Масалимов и А. В. Черников, *Докл. РАН* **384** (2), 1 (2002).
14. V. I. Bruskov, L. V. Malakhova, Z. K. Masalimov, and A. V. Chernikov, *Nucl. Acids Res.* **30**, 1354 (2002).
15. А. В. Черников и В. И. Брусков, *Биофизика* **47** (5), 773 (2002).
16. В. И. Брусков, А. В. Черников, С. В. Гудков и Ж. К. Масалимов, *Биофизика* **48** (6), 1022 (2003).
17. В. С. Смирнова, С. В. Гудков, А. В. Черников и В. И. Брусков, *Биофизика* **50** (2), 243 (2005).
18. А. В. Черников, С. В. Гудков, И. Н. Штаркман и В. И. Брусков, *Биофизика* **52** (2), 244 (2007).
19. И. Н. Штаркман, С. В. Гудков, А. В. Черников и В. И. Брусков, *Биофизика* **53** (1), 1 (2008).
20. С. В. Гудков, О. Э. Карп, С. А. Гармаш и др., *Биофизика* **57** (1), 5 (2012).
21. P. Caraceni, N. DeMaria, H. S. Ryu, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **2**, 339 (1997).
22. J. Du and J. M. Gebicki, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2334 (2004).
23. M. Gracanin, M. A. Lam, P. E. Morgan, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 389 (2011).
24. M. J. Davies, S. Fu and R. T. Dean, *Biochem. J.* **305**, 643 (1995).
25. A. S. Rahmanto, P. E. Morgan, C. L. Hawkins, and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1071 (2010).
26. R. T. Dean, S. Gieseg, and M. J. Davies, *Trends Biochem. Sci.* **18**, 437 (1993).
27. V. Ceranini, J. Gee, E. Fioretti, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 93 (2007).
28. S. V. Avery, *Biochem. J.* **434**, 201 (2011).
29. V. I. Bruskov, N. R. Popova, V. E. Ivanov, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 957 (2014).
30. В. Е. Иванов, О. Э. Карп, Н. Р. Попова и др., *Альманах клинич. медицины* **13**, 17 (2014).
31. О. Э. Карп, С. В. Гудков, С. А. Гармаш и др., *Докл. РАН* **434** (3), 412 (2010).
32. V. I. Bruskov, O. E. Karp, S. A. Garmash, et al., *Free Radic. Res.* **46**, 1280 (2012).

33. С. В. Гудков, И. Н. Штаркман, А. В. Черников и др., Докл. РАН **413** (2), 267 (2007).
34. S. W. Ryter and R. M. Tyrrel, *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1520 (1998).
35. V. E. Ivanov, A. M. Usacheva, A. V. Chernikov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **176**, 36 (2017)
36. S. D. Zakharov and A. V. Ivanov, *Quantum Electron.* **29**, 1031 (1999).
37. S. D. Zakharov, I. M. Korochkin, A. S. Yusupov, et al., *Semiconductors* **48**, 123 (2014).
38. Б. М. Яворский и А. А. Детлаф, *Справочник по физике* (Наука, Гл. ред. физ.-мат. лит., М., 1990), 3-е изд.
39. А. А. Красновский мл., *Биофизика* **49**, 305 (2004).
40. Y. Nakagami, *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, 7469326 (2016).
41. M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 93 (2005).
42. B. Frei, Y. Yamamoto, D. Nielas, and B. N. Ames, *Anal. Biochem.* **175**, 120 (1988).
43. S. Lindquist and E. Craig, *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631 (1988).
44. X. Zhu, P. Wentworth Jr., A. D. Wentworth, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2247 (2004).
45. P. Wentworth Jr., A. D. Wentworth, X. Zhu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1490 (2003).

## Formation of Long-Lived Reactive Protein Species of Gelatin and Casein by the Action of Heat

V.E Ivanov\*, A.V. Chernikov\*, S.V. Gudkov\*\* \*\*\* \*\*\*\*, and V.I. Bruskov\*

*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*\*\*Vladimirsky Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute, ul. Schepkina 61/2, Moscow, 129110 Russia*

*\*\*\*Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia*

*\*\*\*\*Lobachevsky National Research Nizhny Novgorod State University, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

Using the chemiluminescence method, the formation of long-lived reactive protein species of gelatin, casein and casein hydrolyzate with a half-life of about 4 h induced by moderate hyperthermia was demonstrated. It was found that long-lived reactive species of the above mentioned proteins and casein hydrolyzate cause a prolonged generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The mechanism of this process was studied. It is assumed that an increase in the temperature of warm-blooded animals in various diseases is accompanied by the formation of long-lived reactive species of different proteins, and generation of reactive oxygen species by these proteins is one of the mechanisms of activation of protective cellular mechanisms that contribute to overcome disease.

*Keywords: reactive oxygen species, long-lived reactive protein species, hydrogen peroxide, hyperthermia, casein, gelatin*