

Влияние **ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ** АНИОНОВ на ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА в ВОДЕ под ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА

Исследовано влияние биологически значимых анионов в концентрации 1 мМ на процесс образования перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде под действием тепла. Показано, что ряд биологически значимых анионов обладает свойствами слабых восстановителей. Исследованы следующие анионы: сукцинат, ацетат, цитрат, хлорид, бикарбонат, гидроортофосфат, дигидроортофосфат, нитрит и нитрат.

Введение

Среди веществ, присутствующих в любом организме, включая человека, вода составляет наибольшую часть. Причем необходимым является ее постоянное поступление и обновление в организме. Под воздействием различных физических факторов среды в воде образуются активные формы кислорода (АФК), которые играют в организме млекопитающих двоякую роль. С одной стороны, они при концентрациях, превышающих уровень антиоксидантной защиты клеток, вызывают окислительный стресс и приводят к окислительным повреждениям биомолекул, с другой стороны, они являются биологически значимыми продуктами нормального метаболизма и важными сигнально-регуляторными молекулами [1, 2]. Ранее в нашей лаборатории показано, что такие постоянно действующие на организм человека физические факторы, как тепло, видимый свет и инфракрасное излучение также приводят к образованию АФК. Физико-химический механизм образования АФК под действием данных факторов включает следующую совокупность реакций: $O_2 \rightarrow {}^1O_2 \rightarrow O_2^- \rightarrow HO_2 \cdot \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH \cdot$ [3-8]. Ключевым этапом в этом процессе является образование синглетного кислорода и его восстано-

вление до супероксид-анион радикала. Принято считать, что донорами электронов в биологических системах являются преимущественно катионы металлов переменной валентности, такие как железо и медь. В данной работе показано, что в водных растворах в качестве донора электронов могут выступать некоторые биологически значимые анионы.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали сукцинат натрия, ацетат натрия, цитрат натрия, NaCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaNO₂ и NaNO₃ («Sigma», США). Использовали бидистиллированную воду pH 5,6 с удельной электрической проводимостью 120 мкСм/м, насыщенной воздухом в течение суток. При этом концентрация молекулярного кислорода в воде составляла около 270 мкМ. Образцы объемом до 20 мл в герметично закрывающихся стеклянных флаконах («Beckman», США) прогревали при температурах от 40 до 80 °C (±0,1 °C) в термостате U10 («Prüfgerate-Werk Medingen», Германия) в течение различных промежутков времени.

Для определения содержания H₂O₂ в водных растворах использовали высокочувствительный метод усиленной хемилюминесценции в системе люминол — 4-йодофенол — пероксидаза хрена. Измерение хемилюминесценции осуществляли жидкостным сцинтилляционным счетчиком Бета-1 при работе в режиме счета одиночных фотонов (без схемы совпадений). Метод детально описан в работах [9, 10].

В качестве детектора образования в среде доноров электронов был использован реактив Элмана — 5,5-дителиобис(2-нитробензойная кислота (ДТНБ)) («Sigma», США), восстановленная форма которого — 5-тио-2-нитробензойная кислота (ТНБ) имеет характерный спектр погуще-

С.В. Гудков*, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук
А.В. Черников, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

*Адрес для корреспонденции: S_makariy@rambler.ru

ния. Оптическую плотность определяли при 412 нм на спектрофотометре Uvikon 923 В («Kontron Instruments», Италия). Концентрацию ТНБ рассчитывали, используя молярный коэффициент поглощения $12000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ при 412 нм. Условия эксперимента детально описаны в работе [4, 5].

Определение гидроксильных радикалов осуществляли с помощью реакции с кумарин-3-карбоновой кислотой («Aldrich», США), продукт гидроксирования которой — 7-гидрокси-кумарин-3-карбоновая кислота — является чувствительным флуоресцентным зондом для определения образования этих радикалов [11]. Условия проведения эксперимента детально описаны ранее [12].

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) измеряли с помощью ОВП электрода ЭРП-105, подключенного к прибору Эксперт-001 («Эконикс Эксперт», Россия).

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость влияния биологически значимых анионов на процесс образования перекиси водорода под действием тепла. Установлено, что

В.И. Брусков, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией изотопных исследований, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

такие органические анионы как сукцинат-, ацетат-, цитрат- приводят к уменьшению образования перекиси водорода под действием тепла (40°C , 4 ч) примерно в 2-3 раза. Гидроортофосфат-, дигидроортофосфат- и нитрат-анион также снижают образование перекиси водорода при воздействии тепла. Хлорид-анион незначительно усиливает образование перекиси водорода. Бикарбонат- и нитрит-анионы увеличивают продукцию перекиси водорода под действием тепла примерно на 30%. Известно, что бикарбонат-анион способен к одноэлектронному окислению, проявляя свойства восстановителя с образованием бикарбонат-анион радикала [13]. Нитрит-анион также способен окисляться с образованием нитрит радикала, в отличие от нитрата [14]. Данные свойства, вероятно, позволяют этим соединениям быть эффективными донорами электронов в водных растворах.

На рис. 2 представлена зависимость влияния исследованных анионов на процесс образования гидроксильных радикалов в воде под действием тепла (80°C , 2 ч). Установлено, что сукцинат-, ацетат-анионы приводят к уменьшению генерации гидроксильных радикалов под действием тепла примерно на 30-50%. Цитрат-, хлорид- и нитрат-анионы существенно не влияют

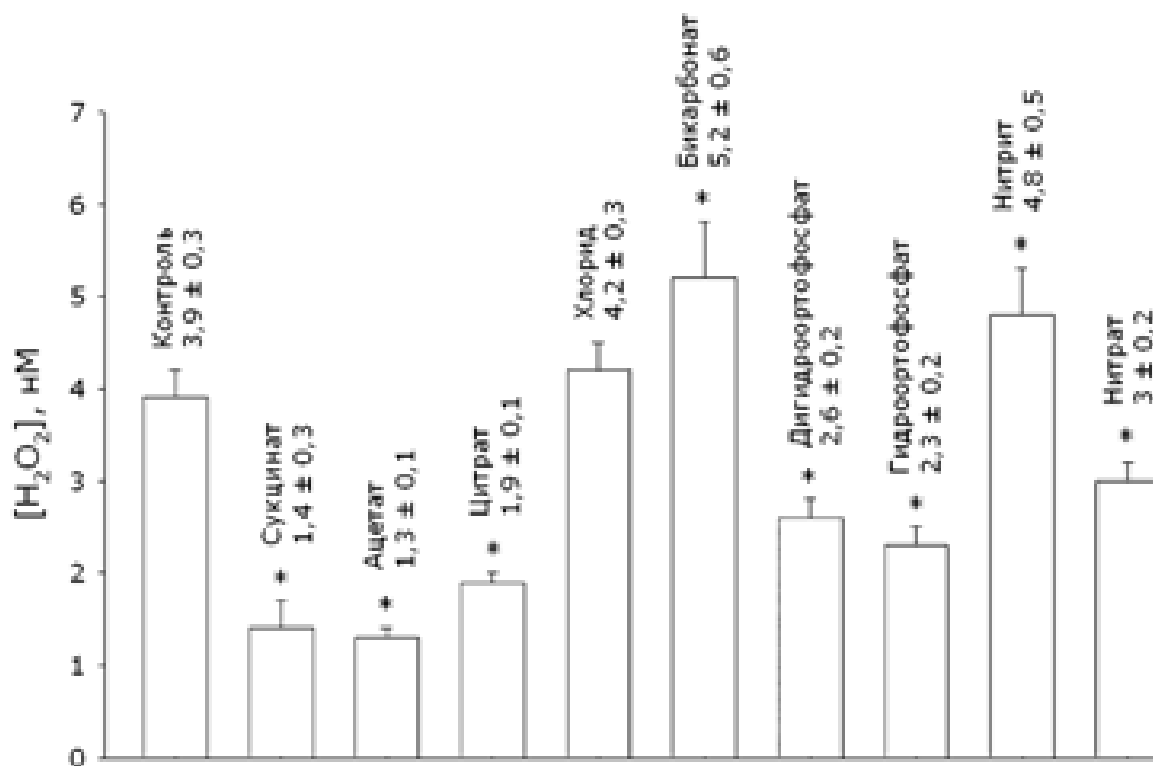


Рис. 1. Влияние биологически значимых анионов в концентрации 1 мМ на процесс образования перекиси водорода в воде под действием тепла (4 ч при 40°C). Приведены усредненные данные 3 независимых опытов и стандартные ошибки. * — отличается от контроля ($P < 0,05$).

на генерацию гидроксильных радикалов. Гидроортофосфат-, дигидроортофосфат-, бикарбонат- и нитрит-анионы увеличивают продукцию гидроксильных радикалов примерно в 1,3–2,5 раза.

Показано, что после воздействия тепла изменяется ОВП солевых растворов. Исходно все исследуемые растворы, кроме бикарбоната, имели ОВП в пределах 250–310 мВ. Растворы бикарбоната имели ОВП 220 ± 10 мВ. После прогрева (40°C , 200 мин) ОВП воды уменьшается на 10%. Сходным образом изменяется ОВП при воздействии тепла на растворы, содержащие 1 мМ сукцинат-, ацетат-, цитрат-, хлорид- и нитрат-анионов. ОВП растворов, содержащих нитрит-анионы, после прогрева уменьшается примерно на 15%. ОВП растворов, содержащих 1 мМ гидроортофосфат-, дигидроортофосфат-, бикарбонат-анионов не изменялся существенным образом. Данные по изменению ОВП после воздействия тепла частично коррелируют с данными по влиянию анионов на процесс генерации гидроксильных радикалов в воде. А именно, гидроортофосфат-, дигидроортофосфат-, бикарбонат- и нитрит-анионы в отличие от остальных исследованных анионов увеличивают продукцию гидроксильных

Ключевые слова: вода, физиологически значимые анионы, перекись водорода, гидроксильный радикал, активные формы кислорода

радикалов под действием тепла. Следует отметить, что это те анионы, которые приводят к изменению ОВП растворов. В качестве сенсора образования в среде донора электронов был использован реактив Элмана (ДТНБ), представляющий собой димер, при восстановлении которого образуются два оптически активных мономера (ТНБ). При прогревании образцов воды, содержащих ДТНБ, в течении 20 мин при температуре 50°C происходит увеличение поглощения растворов в области 412 нм, обусловленное восстановлением ДТНБ в ТНБ. Установлено (рис. 3), что из всех исследованных анионов в концентрации 1 мМ существенную восстановительную активность проявлял бикарбонат-анион, увеличивая восстановление ДТНБ более чем в 2 раза, и несколько меньшую активность проявлял сукцинат. Влияние остальных анионов носило разноразнонаправленный характер, не отличаясь статистически достоверно от контроля.

Известно, что под действием квантов света ряд анионов в воде переходят в возбужденное состояние и затем диссоциируют с образованием сольватированного электрона и анион-радикала ($A_{\text{aq}}^- + h\nu \rightarrow (A_{\text{aq}}^-)^* \rightarrow e_{\text{aq}}^- + A_{\text{aq}}\cdot$) [15]. Показано, что целый ряд анионов,

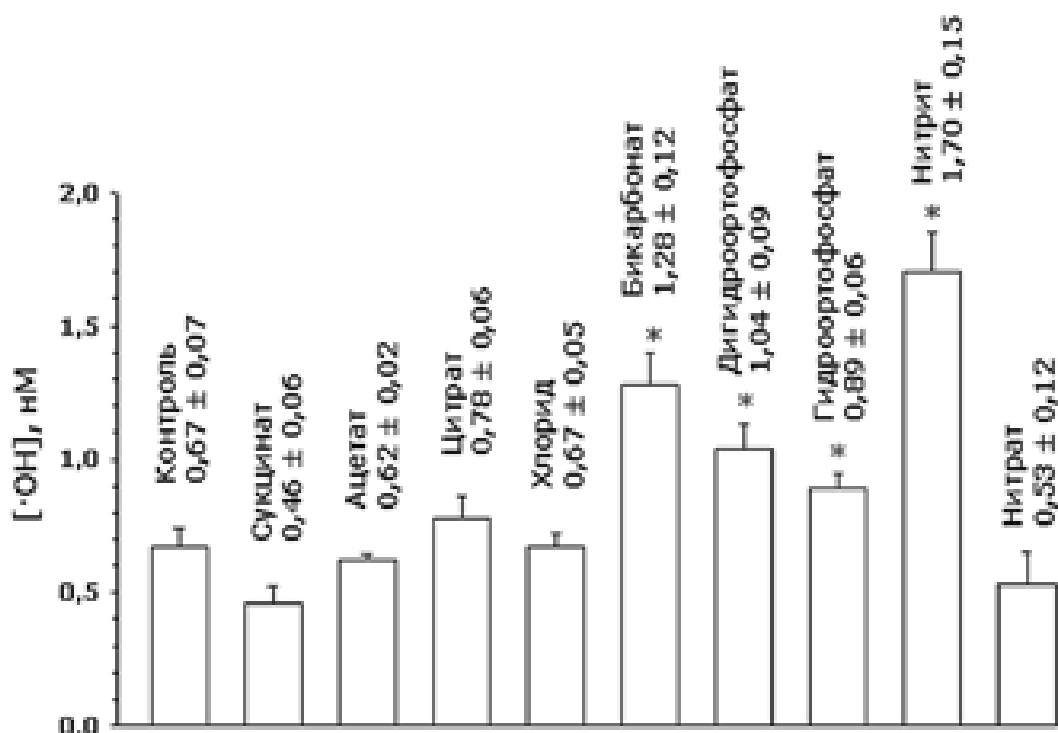


Рис. 2. Влияние биологически значимых анионов в концентрации 1 мМ на процесс генерации гидроксильных радикалов в воде под действием тепла (2 ч при 80°C). Приведены усредненные данные 3 независимых опытов и стандартные ошибки. * — отличается от контроля ($P < 0,05$).

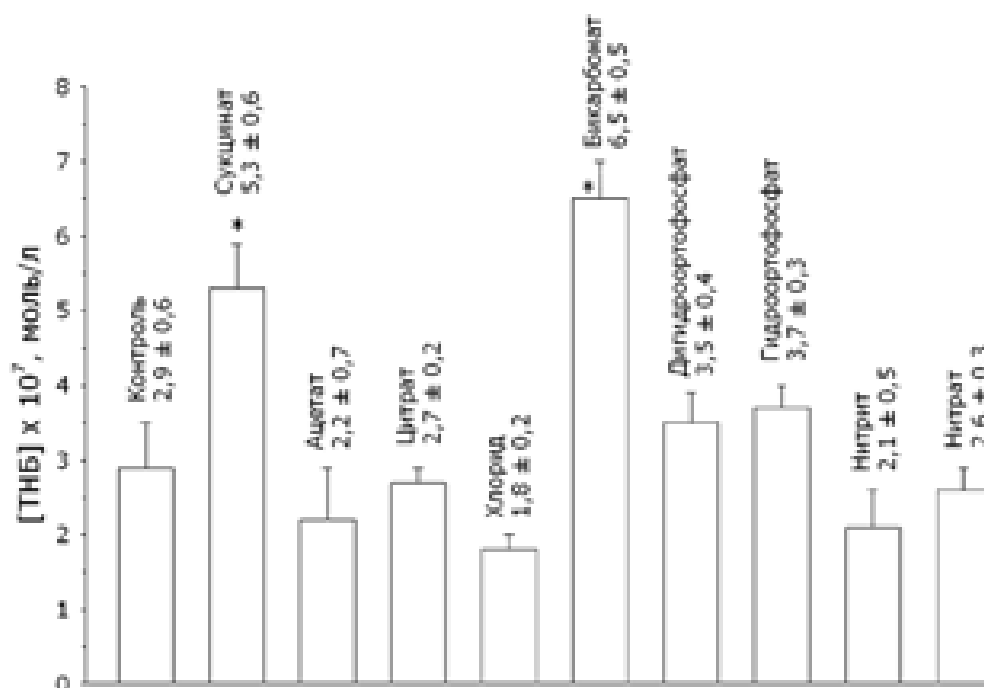


Рис. 3. Влияние биологически значимых анионов в концентрации 1 мМ на процесс восстановления ДТНБ в воде под действием тепла (20 мин при 50 °С). Приведены усредненные данные 3 независимых опытов и стандартные ошибки. * — отличается от контроля ($P < 0,05$).

таких как Cl^- , Br^- , I^- , OH^- , PO_4^{2-} , CO_3^{2-} продуцируют гидратированный электрон при флеш-фотолизе [16]. Поскольку любое вещество при исследуемых температурах обладает тепловым электромагнитным излучением, аналогичным излучению абсолютно черного тела во всем спектре электромагнитных частот, можно полагать, что тепловое воздействие, подобно квантам света, также приводит к аналогичному процессу: $\text{A}_{\text{aq}}^- + kT \rightarrow (\text{A}_{\text{aq}}^-)^* \rightarrow \text{e}_{\text{aq}}^- + \text{A}_{\text{aq}}$, где kT означает действие теплового электромагнитного излучения. Более того, ранее показано, что при тепловом воздействии в полосе поглощения молекулярного кислорода ИК-лазером с длиной волны 1264 нм происходит образование АФК [6, 7]. Образовавшиеся радикалы, в свою очередь, рекомбинируют с образованием молекулярных форм: $\text{A}_{\text{aq}}^- + \text{A}_{\text{aq}}^- = \text{A}_2$, или, если присутствует ряд различных радикалов, то с дополнительным образованием их перекрестных форм. Таким образом, анионы могут выступать в роли восстановителя за счет реакции образования электрон-радикальных пар и последующей рекомбинации радикалов. Причем перекрестная рекомбинация радикалов разных анионов может быть причиной синергического сверхаддитивного эффекта, установленного ранее [4].

Возможные биологические последствия тепловой генерации активных форм кислорода и влияние различных анионов на генерацию гидроксильных радикалов и перекиси водорода могут быть существенными и многообразными. Прежде всего, это процессы, обусловленные внутриклеточным окислительным стрессом — повышенной продукцией АФК,

связанные со многими патофизиологическими последствиями для организма, в том числе с процессом старения [3]. Процесс тепловой генерации АФК является новым веским доводом в пользу свободно-радикальной теории старения, поскольку у пойкилотермных организмов температура окружающей среды является наиболее существенным фактором, определяющим продолжительность жизни [17]. Биорегуляторная, биоэнергетическая и информационная роль АФК в ряде биологических процессов, возникновении и эволюции жизни на Земле рассмотрена ранее [1]. В связи с применением в современной медицине тепла при лечении ряда заболеваний с помощью локально созданной гипертермии при различных физиотерапевтических процедурах представляется актуальным дальнейшее исследование влияния анионов на генерацию биологически значимых АФК при различных состояниях организма.

Заключение

Показано, что биологически значимые анионы в концентрации 1 мМ в существенной степени влияют на процесс образования перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде под действием тепла. При этом бикарбонат и нитрит анионы обладают выраженными проокислительными свойствами, в то время как органические анионы (сукцинат, ацетат и, в меньшей степени, цитрат) — антиокислительными свойствами.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-00730-а) и стипендией Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых (СП-1277.2012.4).

Литература

1. Voeikov V. Reactive oxygen species, water, photons, and life // *Rivista Biol.* 2001. V. 94. P. 237-258.
2. Мирошников А.И. Причина активности растворов после электрохимической обработки: роль хлоридов и окислительно-восстановительного потенциала // *Вода: химия и экология.* 2012. №12. С. 104-110.
3. Bruskov V.I. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. №6. P. 1354-1363.
4. Брусков В.И. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла / В.И. Брусков, А.В. Черников, С.В. Гудков, Ж.К. Масалимов // *Биофизика.* 2003. Т. 48. Вып. 6. С. 1022-1029.
5. Черников А.В. Генерация гидроксильных радикалов и других редокс-активных соединений в морской воде под действием тепла // А.В. Черников, В.И. Брусков // *Биофизика.* 2002. Т. 47. Вып. 5. С. 773-781.
6. Gudkov S.V. Oxygen-dependent auto-oscillations of water luminescence triggered by the 1264 nm radiation / S.V. Gudkov, V.I. Bruskov, M.E. Astashev, A.V. Chernikov, L.S. Yaguzhinsky, S.D. Zakharov // *J. Phys. Chem. B.* 2011. V. 115. №23. P. 7693-7698.
7. Гудков С.В. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода / С.В. Гудков, О.Э. Карп, С.А. Гармаш, В.Е. Иванов, А.В. Черников, А.А. Манохин, М.Е. Асташев, Л.С. Ягужинский, В.И. Брусков // *Биофизика.* 2012. Т. 57. Вып. 1 С. 5-13.
8. Гудков С.В. Образование перекиси водорода в воде при воздействии видимого света / С.В. Гудков, В.С. Смирнова, В.И. Брусков // *Вода: химия и экология.* 2010. №8. С. 40-45.
9. Chernikov A.V. Oxygen effect in heat-induced DNA damage / A.V. Chernikov, S.V. Gudkov, I.N. Shtarkman, V.I. Bruskov // *Biophysics.* 2007. V. 52. P. 185-190.
10. Гудков С.В. Гуанозин и инозин как природные антиоксиданты и радиопротекторы для мышей при действии летальных доз γ -облучения / С.В. Гудков, И.Н. Штаркман, В.С. Смирнова, А.В. Черников, В.И. Брусков // *Доклады Академии наук.* 2006. Т. 407. №1. С. 115-118.
11. Asadullina N.R. Antioxidative and radiation modulating properties of guanosine-5'-monophosphate / N.R. Asadullina, A.M. Usacheva, V.S. Smirnova, S.V.Gudkov // *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 2010. V. 29. P. 786-799.
12. Shtarkman I.N. Effect of amino acids on X-ray-induced hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in water and 8-oxoguanine in DNA / I.N. Shtarkman, S.V. Gudkov, A.V. Chernikov, V.I. Bruskov // *Biochemistry (Moscow).* 2008. V. 73. P. 470-478.
13. Shafirovich V. The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides / V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N.E. Geacintov // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 24621-24626.
14. McIlvin M.R. Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in freshwater and seawater / M.R. McIlvin, M.A. Altabet // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 5589-5595.
15. Shirom M. Excited state chemistry of the ferrocyanide ion in aqueous solution. Formation of the hydrated electron / M.Shirom, G.Stein // *J. Chem.Phys.* 1971. V.55. P.3372-3378.
16. Swenson G.W. Hydrated electron: production and role in photobiology / G.W. Swenson, E.F. Zwicker, L.I. Grossweiner // *Science.* 1963. V. 141. P. 1042-1043.
17. Finkel T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing / T. Finkel, N.J. Holbrook // *Nature.* 2000. V. 408. P. 239-247.

S.V. Gudkov, A.V. Chernikov, V.I. Bruskov

INFLUENCE OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE ANIONS ON FORMATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN WATER UNDER ACTION OF HEAT

Influence of physiologically active anions at 1 mM concentration on formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in water under action of heat was studied. It was shown that some biologically active anions have properties of mild reducing agents. Succinate, acetate, citrate, chloride, bicarbonate, hydroorthophosphate, dihydroorthophosphate, nitrite and nitrate ions were investigated.

Key words: water, physiologically active anions, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, reactive oxygen species