

Таким образом, СТА-3Ф может достаточно эффективно служить маркером уровня кислорода в ткани в сравнении с альтернативными методиками. Особую чувствительность СТА-3Ф проявляет к концентрации генерируемого СК в ткани во время лазерного облучения, причём, по-видимому, лучше других видов замедленной люминесценции ФС. Полученные результаты могут быть полезными в разработке методов мониторинга кислорода в биологических тканях.

Работа поддержана грантом 3.6358.2017/8.9 Министерства образования и науки Российской Федерации.

Список литературы / References:

1. Ormond A.B., Freeman H.S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 2013, vol. 6, pp. 817-840.
2. Hilderbrand S.A. Labels and Probes for Live Cell Imaging: Overview and Selection Guide Live Cell. *Imaging Methods in Molecular Biology*, 2010, vol. 591, pp. 17-45.
3. Nyokong T. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*. Springer Science + Business Media B.V., 2012, ISBN: 978-90-481-3870-8 (Print), 978-90-481-3872-2 (Online).
4. Swartz H.M. Measuring real levels of oxygen *in vivo*: opportunities and challenges. *Biochem. Soc. Trans*, 2002, vol. 30, pp. 248-252.
5. Dmitriev R.I., Papkovsky D.B. Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue. *Cell. Mol. Life Sci*, 2012, vol. 69, pp. 2025-2039.
6. Baier J. [et al.] Time-Resolved Investigations of Singlet Oxygen Luminescence in Water, in Phosphatidylcholine, and in Aqueous Suspensions of Phosphatidylcholine or HT29 Cells. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, no. 7, pp. 3041-3046.
7. Skovsen E., Snyder J.W., Lambert J.D., Ogilby P.R. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J. Phys. Chem B*, 2005, vol. 109, no. 18, pp. 8570-8573.
8. Dedic R., Svoboda A., Psencik J., Hala J. Phosphorescence of singlet oxygen and meso-tetra (4-sulfonatophenyl)porphin: time and spectral resolved study. *J. Mol. Struct*, 2003, vol. 651, pp. 301-304.
9. Piffaretti F. [et al.] Real-time, *in vivo* measurement of tissular pO₂ through the delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX during photodynamic therapy. *J. Biomed. Opt.*, 2012, vol. 17, no. 11, pp. 115007.
10. Mik E.G. [et al.] *In vivo* mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *Biophys. J*, 2008, vol. 95, pp. 3977-3990.
11. Wilson D.F. Oxygen dependent quenching of phosphorescence: a perspective. *Adv. Exp. Med. Biol*, 1992, vol. 317, pp. 195-201.
12. Lin H. Shen Y., Chen D., Lin L. Feasibility Study on Quantitative Measurements of Singlet Oxygen Generation Using Singlet Oxygen Sensor Green. *J. Fluoresc*, 2013, vol. 23, pp. 41-47.
13. Lee S. [et al.] Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen. *J. Biomed. Opt.*, 2008, vol. 13, no. 3, pp. 034010.
14. Scholz M., Biehl A., Dedic R., Hala J. Singlet-oxygen-sensitized delayed fluorescence in mammalian cells: a time-resolved microscopic approach. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 700-713.
15. Letuta S. N. Kuvandykova A.F., Pashkevich S.N., Saletskii A.M. Features of the delayed fluorescence kinetics of exogenous fluorophores in biological tissues. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2013, vol. 87, pp. 1582-1587.
16. Letuta S.N. [et al.] Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2016, vol. 163, pp. 232-236.
17. Celli J.P. [et al.] Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem. Rev*, 2010, vol. 110, pp. 2795-2838.
18. Woodhams J.H., MacRobert A.J., Bown S.G. The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry. *Photochem. Photobiol. Sci*, 2007, vol. 6, pp. 1246-1256.
19. Moiseeva E.V. *Original Approaches to Test Anti-breast Cancer Drugs in a Novel Set of Mouse Models*. Proefschrift Universiteit Utrecht, 2005, 191 p.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ МНОГОАТОМНЫХ ФЕНОЛОВ

Бовт Е.А., Кравченко Е.М., Дорошкевич В.С., Баранова О.В., Одарюк И.Д.

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 83052

e-mail: bio-chem@mail.ru

Аннотация. Изучена кинетика хемилюминесценции в процессе ферментативного окисления многоатомных фенолов молекулярным кислородом в присутствии лакказы из *Trametes versicolor*. Установлен спектральный состав хемилюминесцентного свечения. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют в пользу протекания оксидазного процесса по радикальному механизму.

Ключевые слова: окисление, лакказы, хемилюминесценция, многоатомные фенолы, радикальный механизм.

CHEMILUMINESCENCE IN THE PROCESS OF ENZYMATIC OXIDATION OF POLYATOMIC PHENOLS

Bovt E.A., Kravchenko E.M., Doroshkevich V.S., Baranova O.V., Odaryuk I.D.

Donetsk National University

Universitetskaya St., 24, Donetsk, 83052

e-mail: bio-chem@mail.ru

Annotation. The kinetics of chemiluminescence in the process of enzymatic oxidation of polyatomic phenols by molecular oxygen in the presence of laccase from *Trametes versicolor* was studied. The spectral characteristics of the chemiluminescence emission were established. The experimental data obtained support the occurrence of the oxidase process by a radical mechanism.

Key words: Oxidation, laccase, chemiluminescence, polyatomic phenols, radical mechanism.

Введение. Развитие биотехнологии связано с поиском, выделением и исследованием высокоактивных ферментов. Ферментативные стадии, протекающие в мягких условиях, способны заменить энергоемкие и экологически неблагоприятные многостадийные химические производства. Лакказы, медьсодержащая оксидаза грибов, растений и бактерий [1], примечательна низкой субстратной специфичностью и широким распространением в биообъектах. Как правило, субстратная специфичность лакказ низкая, они катализируют окисление широкого круга органических и неорганических субстратов: двух- и трехатомных фенолов, метокси-производных фенолов, диаминов, комплексов металлов переменной валентности ($[W(CN)_8]^{4-}$, $[Fe(EDTA)]^{2-}$) и т.д. [2]. Поэтому их применяют в органическом синтезе, в биосенсорах, при биодegradации отходов и получении топливных элементов. При разработке новых технологических процессов и модернизации уже имеющихся, получении иммобилизованных препаратов фермента с заданными свойствами, использовании фермента в аналитических целях необходимо знать принципиальный механизм лакказного действия. Выяснению особенностей механизма процесса лакказного окисления фенолов помогают методы, позволяющие фиксировать активные интермедиаты, образующиеся в элементарных реакциях. К одному из таких методов относится хемилуминесцентный (ХЛ) анализ.

Экспериментальная часть. В исследованиях использовали коммерческий препарат лакказы из макромицета *Trametes versicolor*, фирмы «SIGMA». Тролокс, 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат) (ABTS), триметил-, мет.-бутил-, 2,3-дициано-, 2,5-дибром-, 2,5-дихлоргидрохинон и 4-мет.-бутилпирокатехин ($\geq 98\%$), дополнительно не очищали. Пирогаллол, гидрохинон, метилгидрохинон, резорцин, пирокатехин очищали возгонкой, фенол и о-крезол – дистилляцией. Очистка моно- и полигидроксibenзойных, аскорбиновой кислот, флороглюцина, орцина, персульфата калия, лимонной кислоты производилась путем перекристаллизации из бидистиллированной воды или водно-спиртовых растворов.

Цитратный буферный раствор готовили согласно методике, изложенной в [3]. Буферные системы и раствор фермента хранили в холодильнике (+ 4°C), что обеспечивало их стабильность в течение времени исследования. Раствор катион-радикала ABTS готовили за день до опытов по методике [4]. Концентрацию катион-радикала проверяли перед работой спектрофотометрически.

В работе использовали ХЛ-установку с цифровой обработкой сигнала посредством АЦП L-305, LCARD, Россия. Интегральную интенсивность свечения регистрировали фотоумножителем ФЭУ-38. Скоростью подачи воздуха и перемешивания обеспечивали протекание процесса в кинетической области. Анализ спектрального состава ХЛ-свечения, проводили с помощью набора стандартных светофильтров — ГОСТ 9411-66 согласно описанной в [5] методике. Кинетику расходования многоатомных фенолов и накопления продуктов их лакказного окисления исследовали спектрофотометрически на приборе SPECORD S300 UV VIS.

Результаты и их обсуждение. Наличие хемилуминесценции при протекании реакции может дать ценную информацию о ее механизме. При автоокислении в щелочной среде двух- и трехатомных фенолов (в том случае, если в соединении как минимум две гидроксильных группы имеют *орто*- или *пара*-расположение), которые являются субстратами лакказ, наблюдается ХЛ-свечение. Последнее также сопровождает процесс лакказного окисления некоторых фенолов при 308 К в цитратном и фосфатном буферных растворах при pH 4,6 и 5,8 соответственно.

Исследован широкий круг субстратов лакказы *Trametes versicolor* (23 соединения) на предмет наличия ХЛ свечения при их ферментативном окислении. Ни для одного из исследованных одноатомных фенолов ХЛ не зафиксирована. Также свечение не обнаружено при окислении классических субстратов лакказ – гидрохинона и пирокатехина. Однако алкил-производные гидрохинона при ферментативном окислении молекулярным кислородом испускают кванты света. Интересно, что для всех ди- и тригидроксibenзойных кислот (за исключением 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, т.е., соединения, по структуре соответствующего гидрохинону) в процессе окисления наблюдается ХЛ. В некоторых случаях, например, при окислении метилгидрохинона и резорцина, свечение наблюдается только при значительных концентрациях лакказы в реакционной смеси (примерно 200 мг/л и выше).

Интересным объектом для исследования механизма окисления фенолов, катализируемого лакказой *Trametes versicolor*, являются трехатомные фенолы. Ферментативное окисление всех изученных трехатомных фенолов – пирогаллола, флороглюцина, галловой и 2,3,4-тригидроксibenзойной кислот – сопровождается ХЛ. Наиболее интенсивное свечение наблюдается в случае превращения незамещенных трехатомных фенолов.

При окислении флороглюцина, соединения, которое при отщеплении двух электронов не образует хиноидной структуры, интенсивность ХЛ практически сразу после смешения реагентов выходит на максимум, определенный отрезок времени поддерживается на постоянном уровне и затем медленно снижается (см. рис. 1). На начальном этапе превращение пирогаллола и галловой кислоты сопровождается невысоким по отношению к темновому току свечением, поддерживаемым на стационарном уровне непродолжительное время. Далее наблюдается постепенное возрастание интенсивности до максимума и (как и с флороглюцином) последующее затухание свечения. Вид кривых ХЛ всех исследованных соединений сходный с изображенным на рисунке 1 – они имеют один, более или менее выраженный пик. То есть, при окислении многоатомных фенолов, способных образовывать хиноидные структуры, наблюдается два стационарных режима ХЛ, возможно связанных с двумя разными этапами процесса. Форма кинетических ХЛ кривых сложная и вряд ли может быть объяснена в рамках тех схем, которые предлагают для объяснения каталитического действия лакказ [6,7].

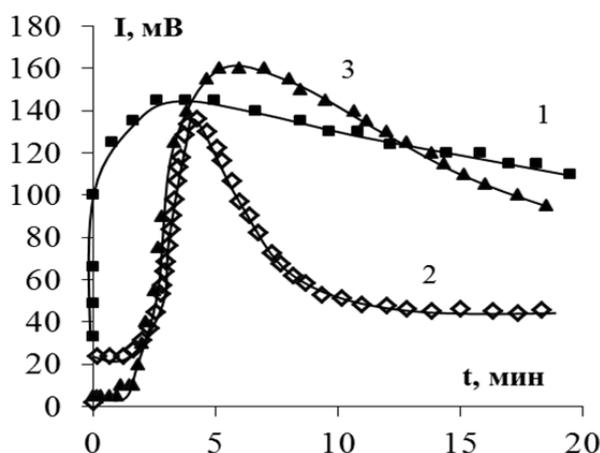


Рисунок 1 – Кинетические кривые ХЛ в реакции лакказного окисления трехатомных фенолов. Цитратный буфер pH 4,6; 308 К; $[E]_0 = 50$ мг/л. 1. – Флороглюцин, $[S]_0 = 0,1$ мМ; 2. – Галловая кислота, $[S]_0 = 1,0$ мМ; 3. – Пирогаллол, $[S]_0 = 0,6$ мМ

Изучено влияние концентрационных параметров реакционной смеси на характеристики ХЛ при окислении трехатомных фенолов. Зависимость максимальной интенсивности ХЛ от концентрации субстрата имеет сложный параболический вид. Причем форма данной зависимости общая для всех исследованных соединений, а оптимальные концентрации изученных субстратов, при ферментативном окислении которых наблюдается максимальное значение интенсивности ХЛ-свечения, отличаются несильно и находятся в интервале 0,15-0,5 мМ. От концентрации фермента тот же параметр зависит нелинейно, кривые этой зависимости имеют четкий излом, хотя классический вид зависимости скорости реакции от $[E]_0$ является линейным.

Время выхода на максимум интенсивности ХЛ (t_{max}), то есть достижения стационарного состояния, также зависит от концентрации фермента и субстрата. При увеличении содержания фермента этот параметр падает по гиперболе, а при увеличении содержания в реакционной смеси субстрата – линейно возрастает для галловой кислоты и пирогаллола, имеет излом для 2,3,4-тригидроксibenзойной кислоты и вид гиперболы для триметилгидрохинона.

Кинетические закономерности реакции лакказного окисления пирогаллола сохраняются при переходе от pH 4,6 к 5,8. Так, величины периодов индукции при варьировании концентрации лакказы изменяются симбатно при переходе от pH 4,6 к 5,8 (см. рис. 2). Также совпадают кинетические закономерности, полученные в реакции лакказного окисления пирогаллола в цитратной и фосфатных буферных системах. Это может указывать на то, что механизм образования эмиттера ХЛ-свечения при ферментативном окислении пирогаллола, а видимо и других фенолов, в определенных пределах не изменяется при переходе от одного значения pH к другому, а также при переходе из одной буферной системы к другой.

Для выяснения природы эмиттеров ХЛ-свечения, которые образуются в процессе окисления многоатомных фенолов в присутствии лакказы *Trametes versicolor*, был изучен спектральный состав свечения. Для получения спектров испускания эмиттеров проводили при одинаковых условиях серию опытов по окислению соответствующего фенола, размещая между реактором и ФЭУ поочередно различные светофильтры, спектр пропускания которых известен.

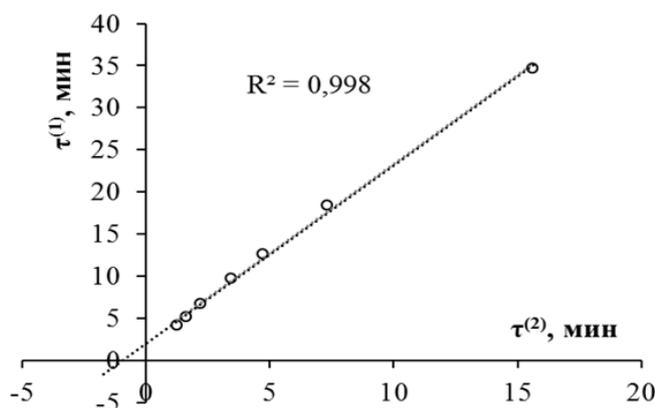


Рисунок 2 – Соотношение периодов индукции в реакции ферментативного окисления пирогаллола кислородом при варьировании концентрации лакказы в фосфатных буферных растворах при pH 5.8 – $\tau^{(1)}$, мин (по оси ординат) и 4.6 – $\tau^{(2)}$, мин (по оси абсцисс). $[S]_0 = 0,5$ mM, 308 K

В процессах каталитического, автоокисления двух- и трехатомных фенолов, а также при использовании их в качестве ингибиторов радикальных реакций жидкофазного окисления углеводородов возникает ХЛ. Вероятными эмиттерами этого свечения могут быть как соответствующие молекулы хинонов, образующиеся в электронно-возбужденном состоянии, так и димольярные комплексы синглетного кислорода [5]. Поскольку круг элементарных реакций возникновения электронно-возбужденных продуктов, испускающих кванты света, достаточно узкий, то установление природы эмиттеров может дать ценные сведения об особенностях механизма ферментативного процесса. Так, в процессе автоокисления гидрохинона в водной среде такой реакцией является, вероятнее всего, рекомбинация семихинонного радикала с гидропероксильным, что показано на схеме [5]:

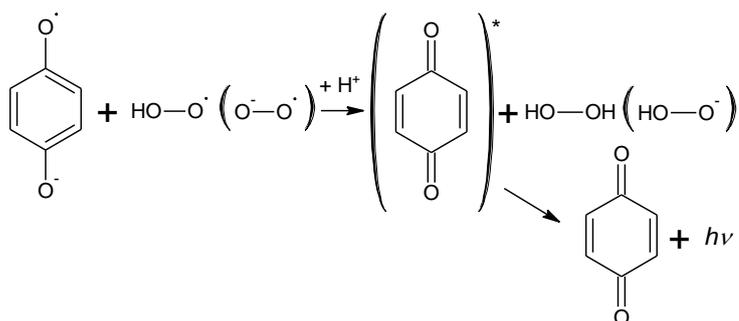


Схема – Образование эмиттера хемилюминесценции при автоокислении гидрохинона в водной среде

Полученные полосы испускания эмиттеров ХЛ свечения имеют разный диапазон волновых величин и значения λ_{max} , как показано, например для флороглюцина и галловой кислоты на рисунке 3. Этот экспериментальный факт ставит под сомнение гипотезу о возникновении свечения вследствие реакции дезактивации димольярных комплексов синглетного кислорода. К тому же, полуширины полос испускания эмиттеров, образующихся при окислении галловой кислоты, триметилгидрохинона и флороглюцина, находятся приблизительно в диапазоне 60-80 нм. Это значительно уже широкой полосы испускания, характерной для свечения димольярных комплексов синглетного кислорода. Даже при ферментативном окислении пирогаллола этот параметр меньше, хотя и составляет 110 нм.

Так как разброс λ_{max} не значителен, это значит, что образующиеся в процессе эмиттеры хемилюминесценции могут принадлежать к одному классу органических соединений. Для сравнения, значения λ_{max} полос эмиттеров при автоокислении в щелочной среде (pH 9,2) пирогаллола и галловой кислоты составляют 527 ± 7 и 559 ± 12 нм соответственно. Максимум полосы эмиттера при автоокислении гидрохинона составляет 550 ± 8 нм [5], т.е., совпадает с λ_{max} , полученным при лакказном окислении триметилгидрохинона ($\lambda_{max} = 550 \pm 20$ нм).

Максимумы полос испускания эмиттеров, образующихся в процессе ферментативного и неферментативного окисления пирогаллола и галловой кислоты, при переходе из цитратного буфера (pH 4.6) к карбонатному (pH 9.2) смещаются в длинноволновую область, а в числовых значениях это составляет 21 и 63 нм. Природа эмиттера, образующегося при лакказном окислении флороглюцина, пока не ясна. Более того, ХЛ-свечение возникает при окислении пирогаллола катион-радикалом АВТС в условиях ферментативного процесса, а λ_{max} полосы испускания этого эмиттера составила 510 ± 10 нм, что не намного меньше, чем полоса эмиттера излучения при лакказном окислении пирогаллола.

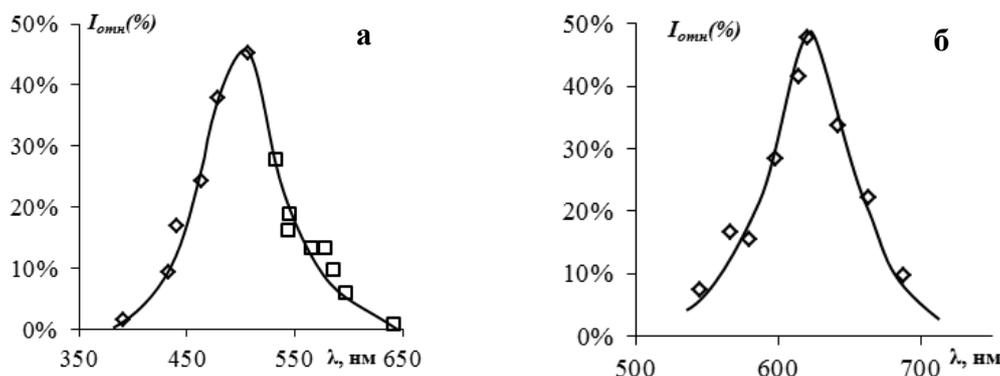


Рисунок 3 – Спектры ХЛ при лакказном окислении фенолов. $[E]_0 = 50$ мг/л, цитратный буфер pH 4,6, T 308 K, а) флороглюцин: $[S]_0 = 0,1$ mM, $\lambda_{max} = 496 \pm 25$ нм; б) галловая кислота: $[S]_0 = 0,25$ mM, $\lambda_{max} = 622 \pm 12$ нм

Таким образом, изучены закономерности хемилюминесценции при лакказном окислении трехатомных фенолов и триметилгидрохинона, превращение которых характеризуется наиболее интенсивным свечением, получены экспериментальные свидетельства того, что данный процесс реализуется по радикальному механизму.

Список литературы / References:

1. Морозова О. В [и др.]. Лакказа-медиаторные системы и их использование: обзор. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2007, т. 43, с. 583-597. [Morozova O.V. Lakkaza-mediator systems and their use: a review. *Prikladnaya biochimia i mikrobiologia*, 2007, vol. 43, pp 583-597. (In Russ.)]
2. Diana M. Mate, Miguel Alcalde. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*, 2015, vol. 33, no. 1, pp. 25-40.
3. Досон Р. [и др.] *Справочник биохимика*. М.: Мир, 1991, 544 с. [Doson P. [et al] *Data for Biochemical Research*. М.: Mir, 1991, 544 p. (In Russ.)]
4. Roberta Re [et al.] Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol. 26. pp. 1231-1237.
5. Шендрик А.Н. [и др.] *Автоокисление фенольных антиоксидантов в водных средах: монография*. Донецк: ДонНУ, 2013, с. 39-40. [Shendrik A.N. [et al]. *Autooxidation of phenolic antioxidants in aqueous media: monograph*, Donetsk: DonNU, 2013, pp 39-40. (In Russ.)]
6. Christopher F.T. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, vol. 140, pp. 19-26.
7. Catherine H. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 2016, vol. 5, pp. 250-266.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ СЛЮНЫ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ХРОНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ

Бельская Л.В.

Омский государственный технический университет
ул. Проспект Мира, 11, г. Омск, 644050, РФ
e-mail: Ludab2005@mail.ru

Аннотация. Приведено сопоставление биохимического состава слюны и интенсивности полос поглощения на ИК-спектрах образцов, полученных в течение суток с интервалом 3 часа. Показано, что ИК-спектры образцов, полученных в дневное и ночное время, существенно отличаются. Так, в дневное время повышается интенсивность полос, соответствующих сахарам и аминокислотным остаткам, но уменьшается интенсивность поглощения липидов и свободных аминокрупп. При этом в дневное время статистически достоверно выше уровень pH и скорость саливации, однако ниже содержание белка и коэффициентов Ca/P и Na/K. Расчет коэффициентов корреляции по Спирмену подтвердил наличие корреляции между содержанием белка в слюне и интенсивностью полос поглощения, соответствующих аминокислотным остаткам и свободным аминокруппам. Таким образом, метод ИК-спектроскопии можно применять для выявления околосуточных изменений состава биологических жидкостей, в частности слюны.

Ключевые слова: слюна, инфракрасная спектроскопия, биохимический состав, околосуточная динамика