

# ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В МАТРИЦЕ ЦИНК-ЗАМЕЩЕННОГО МИОГЛОБИНА

*Лепешкевич С.В.<sup>1</sup>, Пархоц М.В.<sup>1</sup>, Сташевский А.С.<sup>1</sup>,  
Жарникова Е.С.<sup>1</sup>, Бритиков В.В.<sup>2</sup>,  
Усанов С.А.<sup>2</sup>, Джагаров Б.М.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск;

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии, Минск

Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ) – активная форма молекулярного кислорода ( $\text{O}_2$ ), находящегося в возбужденном электронном состоянии  $^1\Delta_g$ . К настоящему времени получены доказательства участия  $^1\text{O}_2$  в фотодинамических реакциях, приводящих к разрушению новообразований. Отличительной особенностью синглетного кислорода от других активных форм кислорода является его способность люминесцировать в ИК-области спектра (~1270 нм), что позволяет осуществлять контроль этого цитотоксического агента в разных средах. Более того, предложено использовать люминесценцию синглетного кислорода в качестве прямого дозиметрического метода фотодинамической терапии. Для успешного использования люминесценции  $^1\text{O}_2$  в качестве дозиметрического метода необходимо знание спектральных и кинетических характеристик  $^1\text{O}_2$  в биологических средах, таких, например, как матрицы белков.

Целью настоящей работы являлось исследование фотосенсибилизированного образования  $^1\text{O}_2$  в белковой матрице Zn-замещенного миоглобина. В данной работе использовался миоглобин, в котором интактный гем заменен на Zn-протопорфирин IX (ZnПП), низшее возбужденное электронное состояние которого является достаточно долгоживущим для фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода. Молекула ZnПП находится в области гемового кармана миоглобина и связана с проксимальным гистидином (His93). Необходимо отметить, что замена иона железа гема на ион цинка не приводит к заметному изменению структуры белка, а также не влияет на конформационную подвижность белка. Для изучения

свечения  $^1\text{O}_2$  внутри белковой матрицы нами был использован наносекундный лазерный флуорометр для ближнего ИК-диапазона [1, 2] и лазерный абсорбционный спектрометр с наносекундным временным разрешением [3, 4]. Zn-замещенный миоглобин получен по методике, описанной ранее [5].

Для описания генерации  $^1\text{O}_2$  внутри белковой матрицы и последующей дезактивации  $^1\text{O}_2$  нами предложена кинетическая модель (рис. 1) [5]. Данная модель содержит минимальное число состояний, необходимых для описания излучательной и безызлучательной дезактивации  $^1\text{O}_2$  как в матрице белка, так и в окружающей водной среде. Модель учитывает вход/выход  $^1\text{O}_2$  внутрь/из белка (рис. 1,  $k'_{\text{entry}}$  и  $k_{\text{escape}}$ ), излучательную и безызлучательную дезактивацию  $^1\text{O}_2$  внутри белка ( $k_r^p$  и  $k_{nr}^p$ , соответственно), излучательную и безызлучательную дезактивацию  $^1\text{O}_2$  снаружи белка молекулами растворителя ( $k_r^s$  и  $k_{nr}^s$ , соответственно), а также безызлучательную дезактивацию  $^1\text{O}_2$  в окружающей водной среде аминокислотными остатками на поверхности белка ( $k_a^s$ ). Значения констант скоростей выхода синглетного кислорода из миоглобина,  $k_{\text{escape}}$  и входа внутрь белка,  $k'_{\text{entry}}$  получены на основании исследований процесса повторного связывания молекулы кислорода нативным миоглобином [5].

На основании измеренных кинетик свечения  $^1\text{O}_2$  в ИК-области спектра (рис. 2) показано, что в среднем шесть из десяти фотосенсибилизированных молекул  $^1\text{O}_2$  покидают белковую матрицу и выходят в окружающую среду. Кроме того, определены константы скорости излучательной,  $k_r^p$ , и безызлучательной дезактивации молекулы  $^1\text{O}_2$  в матрице белка,  $k_{nr}^p$ . Соответствующие константы скоростей имеют значения  $1.7 \pm 0.4 \text{ с}^{-1}$  и  $4.4 \pm 1.1 \text{ мкс}^{-1}$ . Показано, что процесс безызлучательной дезактивации  $^1\text{O}_2$  в матрице белка может быть представлен в виде суммы независимых процессов тушения  $^1\text{O}_2$  всеми аминокислотами белка и фотосенсибилизатором, при этом эффективность дезактивации  $^1\text{O}_2$  отдельно взятым тушителем в белке равна соответствующей эффективности в водной среде:

$$k_{nr}^p = (D_p/D_s) \sum_i k_{nr}^i [Q_i], \quad (1)$$

где  $D_p$  и  $D_s$  – коэффициенты диффузии  $^1\text{O}_2$  в белке и окружа-



ванной фаз, ожидается, что излучательная константа скорости в матрице белка зависит от молекулярных параметров, таких как частота столкновений, молекулярный размер и молекулярная поляризуемость сталкивающихся молекул.

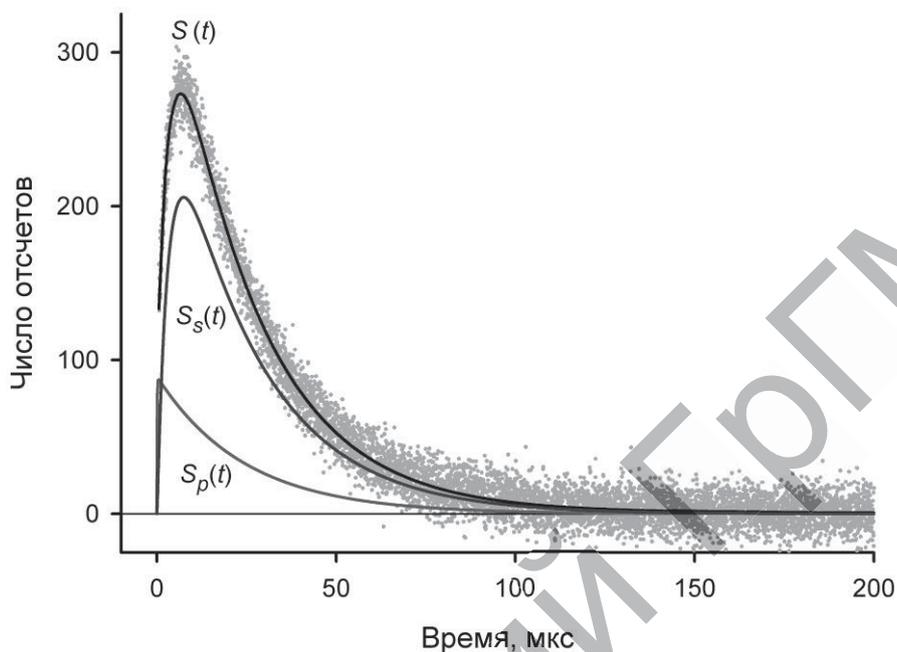


Рисунок 2 – Кинетика люминесценции синглетного кислорода фотосенсибилизированного Zn-замещенным миоглобином.

Экспериментальные данные представлены в виде точек. Сплошная линия  $S(t)$  представляет результат аппроксимации функцией вида  $S(t) = \chi_1 e^{-\alpha_1 t} - \chi_2 e^{-\alpha_2 t}$ .  $S_s(t)$  и  $S_p(t)$  – временные зависимости свечения  $^1\text{O}_2$  в окружающем белок водном буфере и в матрице белка, соответственно. Длина волны возбуждения и регистрации, соответственно, 532 и 1270 нм

Авторы благодарят Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (№ Ф11М-084, Ф13-016) за финансовую поддержку.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сташевский А.С., Галиевский В.А., Джагаров Б.М. Высокочувствительные лазерные флуорометры для ближнего инфракрасного и видимого диапазонов // Приборы и методы измерений. – 2011. – № 1(2). – С. 25-31.
2. Lepeshkevich S.V., Stasheuski A.S., Parkhats M.V., Galievsky V.A., Dzhagarov B.M. Does photodissociation of molecular oxygen from myoglobin and hemoglobin yield singlet oxygen? // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 2013. – Vol. 120. – P. 130-141.
3. Lepeshkevich S.V., Dzhagarov B.M. Effect of zinc and cadmium ions on structure and function of myoglobin // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1794, № 1. – P. 103-109.
4. Lepeshkevich S.V., Parkhats M.V., Stepuro I.I., Dzhagarov B.M. Molecular oxygen binding with  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within the R quaternary state of human he-

moglobin in solutions and porous sol-gel matrices // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1794, № 12. – P. 1823-1830.

5. Lepeshkevich S.V., Parkhats M.V., Stasheuski A.S., Britikov V.V., Jarnikova E.S., Usanov S.A., Dzhagarov B.M. Photosensitized Singlet Oxygen Luminescence from the Protein Matrix of Zn-Substituted Myoglobin // J. Phys. Chem. A. – 2014. – Vol. 118, № 10. – P. 1864-1878.

## **БИОФИЗИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ**

*Лисуха Л.М., Березовский В.А.,  
Степанова Е.И.<sup>1</sup>, Колпаков И.Е.\**

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев;  
<sup>1</sup>ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины  
НАМН Украины», Киев\*

Болезни органов дыхания у детей, проживающих на радиоактивно загрязненных территориях, в структуре заболеваемости находятся на первом месте. При хронической патологии органов дыхания, которая сопровождается бронхоспазмом, нарушается баланс между потребностью и доставкой кислорода. Нарушение вентиляционной способности легких приводит к развитию гипоксической гипоксии. Медикаментозная терапия не всегда обеспечивает ликвидацию кислородной недостаточности.

**Цель** нашей работы – изучить эффективность использования биофизической коррекции гипоксических состояний у детей при заболеваниях легких, которые проживают на радиоактивно загрязненных территориях, за счет применения инструментальной оротерапии (ИНО).

Обследованы 32 ребенка в возрасте 6-17 лет, которые находились на стационарном лечении в клинике ГУ «ННЦРМ НАМНУ» (с хроническим обструктивным бронхитом, бронхиальной астмой, пневмонией). Исследование вентиляционной способности легких проводили при помощи пневмотахометра автоматизированного ПТА-1, отечественного производства. Для дыхания гипоксической газовой смесью (ГГС) использовали аппарат «Борей» производства медико-инженерного центра «НОРТ»,