

УДК 535.8 + 547.8/963

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С БИОПОЛИМЕРАМИ НА ПРИМЕРЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

© 2020 г. Е.Ф. Немова\*, \*\*\*, О.П. Черкасова\*, Н.А. Николаев\*, \*\*, Г.Г. Дульцева\*\*\*

\*Институт лазерной физики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 13/3

E-mail: endy.endy@gmail.com

\*\*Институт автоматики и электрометрии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1

\*\*\*Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,

630090, Новосибирск, ул. Институтская, 3

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 17.02.2020 г.

Методом ЭПР-спектроскопии в присутствии спиновой ловушки и спинового зонда исследовано влияние терагерцового излучения на функциональную активность бычьего сывороточного альбумина. Применение рН-чувствительной имидазолиновой спиновой ловушки позволило зафиксировать изменение прочности связывания альбумина с оксидом азота. При помощи спинового зонда, образующегося непосредственно в водном растворе альбумина из предшественника – дигидропиразиндиоксида, — показано, что под воздействием терагерцового облучения изменяются интенсивность и ширина линий в спектре ЭПР спинового зонда, что свидетельствует об изменении числа и подвижности парамагнитных центров. Наблюдаемые изменения соотнесены со структурными характеристиками реакционных центров бычьего сывороточного альбумина — функциональных групп аминокислот, входящих в состав белка.

*Ключевые слова:* терагерцовое излучение, бычий сывороточный альбумин, ЭПР-спектроскопия, спиновая ловушка, спиновый зонд, конформация.

DOI: 10.31857/S0006302920030072

Терагерцовое излучение охватывает спектральный диапазон от 0.1 до 10 ТГц, располагаясь между микроволновой и инфракрасной областями [1]. Это излучение поглощается водой, и одни из первых примеров биомедицинских применений этого излучения были связаны со слежением за изменениями содержания воды в биологических объектах [2]. Проводились исследования биологических эффектов терагерцового излучения на клеточном уровне [3] и на уровне организма [4]. Так, например, сообщалось об обнаружении влияния терагерцового излучения на изменение числа мутаций у дрозофил после предварительной обработки гамма-излучением [5]. Было обнаружено влияние терагерцового излучения на ДНК человеческих лейкоцитов [6] и

на фибробласты [7]. Интерес к изучению биологических эффектов терагерцового излучения связан с тем, что у многих биологических полимеров частоты колебательно-вращательных переходов лежат в этой спектральной области. Энергии кванта терагерцового излучения недостаточно для разрыва даже слабых водородных связей, поэтому не приходится ожидать прямого химического действия излучения в этом диапазоне. Энергетически область терагерцового излучения соответствует коллективным колебательно-вращательным переходам, и именно в изменениях конформаций сложных молекул могут быть причины экспериментально наблюдавшегося влияния терагерцового излучения на биообъекты, хотя детальные молекулярные механизмы такого влияния остаются малоизученными. Механизмы влияния терагерцового излучения необходимо изучать на всех уровнях организации биологической материи: от молекул до клеток и целого ор-

*Сокращения:* БСА — бычий сывороточный альбумин, ДПДО — 1,4-дигидропиразиндиоксид, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, ПМИО — 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксид.

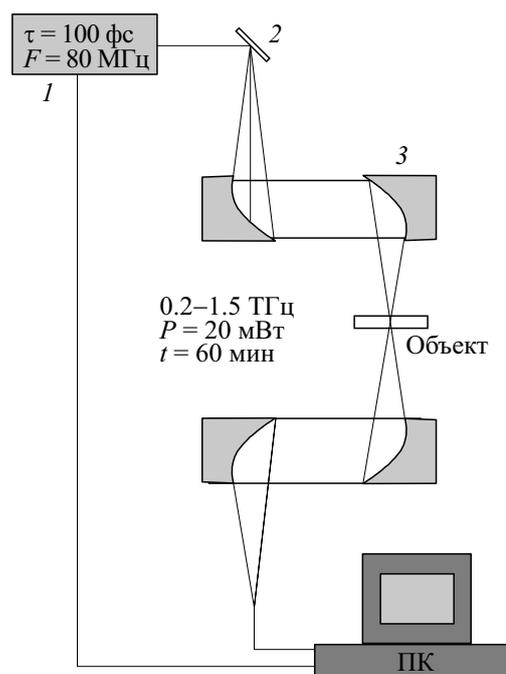
ганизма. Так, было исследовано изменение отклика в терагерцовой области в зависимости от степени окисления для цитохрома *c* [8], изучалось связывание белков с лигандами [9, 10], влияние на гибкость структуры белка с рассмотрением коллективных структурных переходов [11], а также влияние на динамику сольватации пептидов [12].

Данная работа базируется на результатах предыдущих исследований влияния терагерцового излучения на конформации пептидов [13, 14]. В этих работах было обнаружено влияние облучения белковых препаратов на последующую адсорбцию кислорода на реакционных центрах молекулы белка. Было высказано предположение, что одной из причин такого действия излучения может быть вызванное облучением изменение конформации белковой молекулы, приведшее к изменению стерических условий для доступа молекулы кислорода к реакционным центрам. В настоящей работе сделана попытка изучить молекулярный механизм влияния терагерцового излучения на транспортные свойства бычьего сывороточного альбумина (БСА) — водорастворимого глобулярного белка, структура и свойства которого хорошо изучены.

Альбумины выполняют в организме в основном транспортные функции: перенос липидов, билирубина, жирных кислот, аминокислот, ионов металлов [15]. Альбумины в крови также связываются с лекарственными веществами и осуществляют их перенос к органам. При выполнении белком транспортной функции важна возможность обратимой адсорбции, так как переносимый компонент должен связаться с белком достаточно прочно, чтобы переместиться с белком по кровотоку, но затем должна осуществиться десорбция переносимого компонента в органе-мишени. Для адсорбции, помимо размерного соответствия реагирующего фрагмента биомолекулы и лиганда, важна трехмерная структура адсорбционного центра, поэтому ясно, что изменения конформации молекулы белка могут приводить к существенным изменениям биологической активности. В данной работе исследовано влияние терагерцового излучения на изменение прочности связывания БСА с оксидом азота.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

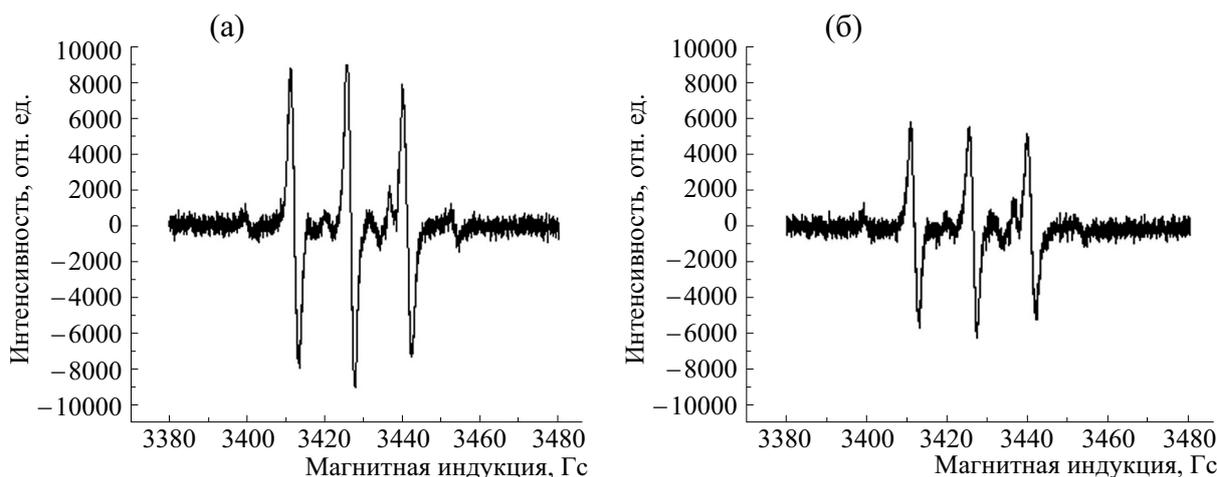
В работе изучали пленочные препараты лиофилизированного БСА (Sigma-Aldrich, США), приготовленные нанесением 50 мкл водного раствора белка с концентрацией 1 мг/мл на предварительно очищенную подложку из кристалличе-



**Рис. 1.** Схема установки для облучения пленочных образцов бычьего сывороточного альбумина: 1 — фемтосекундный волоконный лазер, 2 — кристалл InSb для генерации терагерцового излучения, 3 — оптическая схема терагерцового спектрометра.

ского кварца. Нанесенную каплю распределяли покровным стеклом по поверхности подложки, затем образец высушивали в токе воздуха при атмосферном давлении и комнатной температуре. Относительная влажность воздуха при нанесении и сушке образца поддерживалась на уровне не выше 40%. Образцы хранили в эксикаторе над обезвоженным силикагелем. Толщина полученных пленок составляет 1–3 мкм, как было показано эллипсометрическими измерениями [16].

Облучение пленочных образцов проводили на установке, схема которой приведена на рис. 1. Подробнее установка была описана ранее [17]. Источник терагерцового излучения работает в импульсном режиме. Длительность импульса — 2–3 пс, частота следования ~ 80 МГц, спектр излучения 0.2–1.5 ТГц, пиковая мощность 20 мВт. Длительность облучения исследуемого объекта составляла 60 мин. Все образцы готовили парами: экспериментальный и контрольный. Контрольный образец находился в тех же условиях, что и экспериментальный, но его не облучали. В предварительных опытах было показано при помощи контроля температуры пленки в процессе облучения, а также при помощи нагревания контрольных образцов до заданной температуры, что вли-



**Рис. 2.** Спектры ЭПР нитроксильного радикала, образовавшегося из дигидропиразиндиоксида в присутствии облученного (а) и необлученного (б) бычьего сывороточного альбумина.

яние облучения на химические свойства пленки не связано с ее нагревом [16].

В качестве предшественника спинового зонда использовали органическое соединение класса динитронов, синтезированное в Новосибирском институте органической химии (НИОХ СО РАН), — 1,4-дигидропиразиндиоксид (ДПДО) [18]. Концентрация соединения в растворе для исследования методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) составляла 7 мМ. Для оценки адсорбции кислорода на реакционных центрах молекулы БСА и для определения локальных изменений рН вблизи центров адсорбции оксида азота применяли имидазолиновый нитрон — 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксид (ПМИО), также синтезированный в НИОХ СО РАН [18]. Перед использованием это соединение очищали возгонкой при пониженном давлении. Концентрация ПМИО в растворе для исследования методом ЭПР составляла 2 мМ.

Оксид азота (II) получали по реакции нитрита натрия с хлоридом железа (II) в присутствии соляной кислоты (все реактивы — квалификации «х.ч.»). Реакцию проводили в круглодонной трехгорлой колбе, соединенной с буферной емкостью для получения равномерного потока газа. После обработки пленочного препарата альбумина в потоке газообразного оксида азота пленку смывали дистиллированной водой (500 мкл) в стандартную ампулу для ЭПР-спектроскопии водных растворов, приливали раствор спиновой ловушки и производили запись спектров ЭПР.

Спектры ЭПР записывали на приборе Bruker EMX (Bruker, Германия). Микроволновая мощность не превышала 10 мВт. Амплитуда модуля-

ции составляла 0.3–1.0 Гс, частота модуляции 100 кГц, усиление  $1 \cdot 10^4$ – $5.6 \cdot 10^5$ , постоянная времени 0.2 с, развертка 100 Гс/200 с, микроволновая частота 9.6 ГГц. Константы сверхтонкого расщепления определяли с точностью не менее 0.02 Гс. Количественные измерения интенсивности сигнала ЭПР проводили при помощи внешнего стандарта — кристалла дифенилпикрилгидрида, прикрепленного к внешней стороне плоской кварцевой ампулы для ЭПР-спектроскопии водных растворов.

Расчет структуры реакционных центров и оценку выигрыша энергии при адсорбции кислорода и оксида азота на функциональных центрах БСА проводили при помощи программы CS Chem 3D Pro, версия 5.0 (Cambridge Soft Corporation, Великобритания). В программе используются расчетные методы *MNDO*, *AM1*, *PM3*, а также *MM2* [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Образование парамагнитных центров в присутствии предшественника спинового зонда (1,4-дигидропиразиндиоксида).** Было обнаружено, что диамагнитное соединение ДПДО в водных растворах альбумина частично превращается в нитроксильный радикал, который легко зарегистрировать методом ЭПР-спектроскопии. Этот сигнал представляет собой триплет с константой сверхтонкого расщепления  $a_N = 14.7$  Гс (рис. 2). При помощи внешнего стандарта интенсивности было проведено сравнение интенсивностей сигналов ЭПР нитроксильного радикала, образовавшегося из ДПДО в растворе альбумина, облученного терагерцовым излучением, и в растворе не-

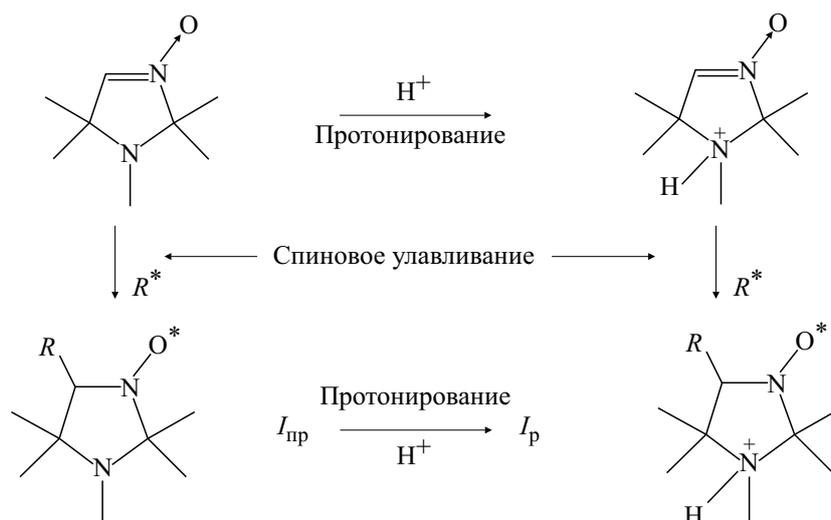


Рис. 3. Схема протонирования и спинового улавливания для спиновой ловушки 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксида.

облученного альбумина. Сравнение показало, что интенсивность сигнала в первом случае примерно в 1.6 раза больше, чем во втором. Это означает, что число возникающих парамагнитных центров больше в случае облученного альбумина. Было также отмечено, что ширина линий в спектре ЭПР ДПДО в присутствии облученного БСА ( $2.14 \pm 0.02$  Гс) больше, чем в случае необлученного ( $1.81 \pm 0.02$  Гс). Как видим, различие составляет около 15%. Ширина линий в спектре ЭПР связана с подвижностью парамагнитного центра: если подвижность велика, то происходит сужение линии. Таким образом, видно, что парамагнитные центры, возникающие в присутствии облученного альбумина, менее подвижны по сравнению с необлученным.

В предположении, что образованию парамагнитных центров способствует адсорбция кислорода на группах альбумина, было проведено моделирование энергетики процесса адсорбции при помощи программы CS Chem 3D Pro. При моделировании искали положения атомов, отвечающие локальным минимумам потенциальной энергии. Было показано, что наибольший выигрыш энергии дает адсорбция кислорода на сульфгидрильных группах, а также на пирролидиновом цикле, который является частью пролинового фрагмента структуры белка. Эти группы полярны и участвуют в образовании водородных связей, стабилизирующих пространственное строение молекулы альбумина. Ранее было показано, что в результате облучения альбумина терагерцовым излучением изменяется число альфа-спиралей, в образовании которых решающая роль принадлежит как раз пролиновому фрагменту, который обеспечивает резкий изгиб полипептидной цепи

[20]. Таким образом, терагерцовое излучение вызывает некоторое изменение конформации молекулы альбумина, а это приводит к увеличению адсорбции кислорода на реакционных центрах белка. Следует отметить, что зависимость окислительных свойств от облучения в терагерцовом диапазоне для альбуминов ранее не была описана.

**Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с оксидом азота (II).** Оксид азота NO контролирует многие функции в различных клетках организма, кроме того, было установлено, что это соединение играет роль внутриклеточного мессенджера. Обзор результатов изучения многообразных биологических функций оксида азота представлен, например, в работах [21, 22]. Одним из свойств NO является его способность образовывать комплекс с альбумином. Для изучения связывания БСА с оксидом азота NO пленочные препараты альбумина обрабатывали потоком газообразного оксида азота, выделяющегося в отдельном реакционном сосуде при взаимодействии хлорида железа (II) с нитритом натрия в присутствии соляной кислоты. Оксид азота — парамагнитная молекула, во многих реакциях ведущая себе как свободный радикал. Для исследования описанной реакционной системы была использована спиновая ловушка класса имидазолин-оксидов (ПМИО), обладающая чувствительностью к pH среды. Это свойство позволяет использовать ловушку для измерения pH в микроокружении радикального центра. Чувствительность спиновой ловушки к кислотности среды определяется наличием в ее молекуле аминного атома азота, способного к протонированию. Было показано, что ловушка эффективно улавливает

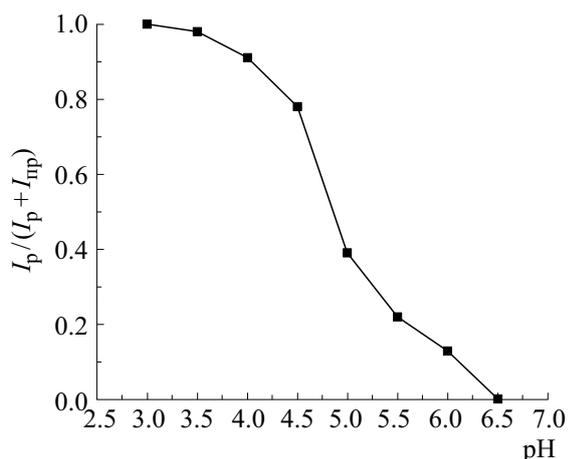


Рис. 4. Кривая титрования спиновой ловушки 1,2,2,5,5-пентаметил-3-имидазолин-3-оксида.

короткоживущие свободные радикалы как в протонированной форме, так и в непротонированной. Схема процессов протонирования и спинового улавливания приведена на рис. 3. Параметры спектров ЭПР протонированных и непротонированных спиновых аддуктов различаются, причем в области pH от 3 до 6 в спектрах ЭПР наблюдаются оба аддукта. По отношению интенсивности  $I_p$  сигнала, соответствующего протонированному спиновому аддукту, к сумме интенсивностей сигналов протонированного  $I_p$  и непротонированного  $I_{np}$  аддуктов  $I_p / (I_p + I_{np})$  удалось построить кривую титрования для ловушки в водном растворе, в котором кислотность среды формировали добавками соляной кислоты и едкого натра и измеряли лабораторным pH-метром. Полученная кривая титрования приведена на рис. 4. Измерив в спектре ЭПР спинового аддукта ловушки ПМИО величину  $I_p / (I_p + I_{np})$ , можно при помощи кривой титрования оценить величину pH.

Пример спектра, содержащего сигналы одновременно протонированного и непротонированного спиновых аддуктов, показан на рис. 5. Были получены отношения интенсивностей  $I_p / (I_p + I_{np})$  для облученного БСА  $0.27 \pm 0.02$  (что приблизительно соответствует pH 5.3) и для необлученного —  $0.17 \pm 0.03$  (pH ~ 5.6). Таким образом, при помощи кривой титрования было установлено, что взаимодействие облученного альбумина с оксидом азота приводит к более сильному локальному закислению, чем необлученного. Образование кислоты в растворе происходит за счет присутствия диоксида азота, который является продуктом окисления NO кислородом воздуха и кислородом, адсорбированным на группах альбумина. Присутствие диоксида азота в водном рас-

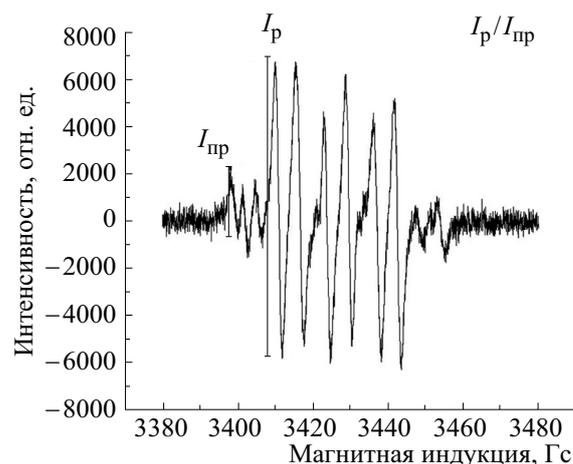


Рис. 5. Спектр ЭПР, содержащий сигналы от протонированной и непротонированной форм спинового аддукта.

творе создает кислую среду, что приводит к протонированию ловушки. Таким образом, чем сильнее наблюдаемое закисление, тем выше концентрация диоксида азота в растворе. В случае облученного альбумина конверсия  $NO \rightarrow NO_2$  идет быстрее, а значит, под действием терагерцового излучения связывание оксида азота с альбумином ослабевает.

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что вызываемые терагерцовым излучением колебательно-вращательные переходы в молекуле БСА частично снимают стерические затруднения для адсорбции кислорода на функциональных группах БСА, содержащих азот и серу, облегчая тем самым адсорбционное взаимодействие с кислородом. Вторичная и третичная структуры взаимозависимы от адсорбции кислорода, поскольку обусловлены водородными связями, которые участвуют и в адсорбционных взаимодействиях [23]. Для реализации экспериментально обнаруженного уменьшения связывания оксида азота с реакционными центрами БСА под действием терагерцового излучения должен быть облегчен доступ оксида азота к окислительным центрам, на которых адсорбирован кислород. Моделирование показало, что для этого необходим конформационный переход с участием азотсодержащих гетероциклов и тиольных групп.

Для того чтобы понять природу конформационного перехода, вызываемого в молекуле БСА терагерцовым излучением, результаты квантово-химического исследования были дополнены моделированием пространственной структуры путем последовательного «отключения» функциональных групп, участвующих в ее формировании.

Это позволило определить группы, вовлеченные в наблюдаемый конформационный переход. Ключевым структурным звеном, обеспечивающим конформационный переход, оказался пролиновый фрагмент. По-видимому, терагерцовое излучение возбуждает вращательные моды в петлях, связанных с пролиновыми звеньями БСА [23]. Для экспериментального подтверждения полученных результатов предлагается подобрать лиганды для селективного связывания функциональных групп в этих петлях и исследовать влияние такого связывания на конформационный переход.

## ВЫВОДЫ

Показано, что облучение пленочных препаратов альбумина терагерцовым излучением приводит к увеличению адсорбции кислорода на реакционных центрах альбумина и ослаблению связывания альбумина с оксидом азота. При помощи квантовохимического моделирования были выявлены участки первичной структуры альбумина, обеспечивающие эффективную адсорбцию кислорода:  $-SH$ ,  $-S-S-$ ,  $=NH$ , атом азота пирролидинового гетероцикла. Моделирование пространственной структуры показало, что причиной наблюдаемых явлений может быть конформационный переход с участием пролинового фрагмента.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Центр коллективного пользования «Спектроскопия и оптика» Института автоматики и электрометрии СО РАН за предоставленный источник терагерцового излучения.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены в рамках государственной программы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (AAAA-A17- 117030310290-5).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y.-S. Lee, *Principles of Terahertz Science and Technology* (Springer-Verlag, USA, 2009).
2. M. Van Exter, C. Fattinger, and D. Grischkowsky, *Opt. Lett.* **14**, 1128 (1989).
3. В. И. Федоров, Д. С. Сердюков, О. П. Черкасова и др., *Оптич. журн.* **84** (8), 9 (2017).
4. I. Ilina, D. S. Sitnikov, and M. B. Agranat, *High Temperature* **56** (5), 789 (2018).
5. В. И. Федоров, А. С. Погодин, Т. Д. Дубатолова и др., *Биофизика* **46** (2), 298 (2001).
6. A. A. Angeluts, A. B. Gapeyev, M. N. Esaulkov, et al., *Quantum Electronics* **44** (3), 247 (2014).
7. G. J. Wilmink, B. D. Rivest, C. C. Roth, et al., *Lasers Surg. Med.* **44**, 152 (2011).
8. J.-Y. Chen, J. R. Knab, J. Cerne, et al., *Phys. Rev. E* **72** (4), 040901 (2005).
9. J. Chen, J. Knab, S. Ye, et al., *Appl. Phys. Lett.* **90**, 243901 (2007).
10. О. П. Черкасова, В. И. Федоров, Е. Ф. Немова и А. С. Погодин, *Оптика и спектроскопия* **107** (4), 566 (2009).
11. B. Born, S. J. Kim, S. Ebbinghaus, et al., *Faraday Discuss.* **141**, 161 (2009).
12. B. Born, H. Weingärtner, E. Bründermann, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 3752 (2009).
13. E. F. Nemova, O. P. Cherkasova, and V. I. Fedorov, *Proc. SPIE* **7993**, 799325-1 (2010).
14. O. P. Cherkasova, V. I. Fedorov, E. F. Nemova, et al., *Proc. SPIE* **6727**, 672721-1 (2007).
15. A. Farrugia, *Transfusion Med. Rev.* **24** (1), 53 (2010).
16. А. В. Капралова и А. С. Погодин, *Вестн. НГУ. Сер. Физика* **5** (4), 182 (2010).
17. В. Д. Анцыгин, А. А. Мамрашев, Н. А. Николаев и др., *Автометрия* **46** (3), 110 (2010).
18. G. G. Dultseva, G. I. Skubnevskaya, A. Ya. Tikhonov, et al., *J. Phys. Chem.*, **100** (44), 17523 (1996).
19. F. N. Dultsev and G. G. Dultseva, *Chem. Engineer. Sci.* **1** (2), 17 (2013).
20. V. M. Govorun, V. E. Tretiakov, N. N. Tulyakov, et al., *Int. J. Infrared Millimeter Waves* **12** (12), 1469 (1991).
21. A. C. Pereira, M. Paulo, A. V. Araujo, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44** (9), 947 (2011).
22. А. Ф. Ванин, *Успехи физ. наук*, **170** (4), 455 (2000).
23. В. И. Федоров, Н. Я. Вайсман, Е. Ф. Немова и др., *Биофизика* **58** (6), 1043 (2013).

## Investigation of the Molecular Mechanisms of the Interaction between Terahertz Radiation and Biopolymers: A Case Study on Bovine Serum Albumin

E.F. Nemova<sup>\*, \*\*\*</sup>, O.P. Cherkasova<sup>\*</sup>, N.A. Nikolaev<sup>\*, \*\*</sup>, and G.G. Dultseva<sup>\*\*\*</sup>

*\*Institute of Laser Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
prosp. Lavrentyeva 13/3, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*\*Institute of Automation and Electrometry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences  
, prosp. Akademika Koptuyuga 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*\*\*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Institutskaya ul. 3, Novosibirsk, 630090 Russia*

Electron paramagnetic resonance spin trapping and spin probing techniques were used to investigate the effect of terahertz radiation on the functional activity of bovine serum albumin. Using a pH-sensitive imidazoline spin trap it was possible to detect changes in the binding strength of nitrogen oxide to albumin. With the help of a spin probe formed directly in the aqueous solution of albumin from a dihydropyrazine dioxide precursor it was shown that terahertz radiation causes changes in the signal intensity and widths of EPR spectral lines of the spin probe, which is the evidence of changes in the number and mobility of paramagnetic centers. The observed changes were compared to the structural characteristics of reaction centers in bovine serum albumin—functional groups of amino acids incorporated into the protein.

*Keywords: terahertz radiation, bovine serum albumin, EPR spectroscopy, spin trap, spin probe, conformation*