

## АНАЛИЗ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БЫКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЛИННОВОЛНОВОГО КВАЗИМОНОХРОМАТИЧЕСКОГО УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

И. А. Колтаков, Д. Ю. Луковиков, А. Н. Барилюк, Ю. С. Каргашова,  
А. Я. Гокбаева, С. Н. Ливенцева, В. Г. Артюхов

*Воронежский Государственный Университет*

Поступила в редакцию 20.01.2022 г.

**Аннотация.** Воздействие высокоэнергетических излучений на белки обычно связано с поглощением энергии света его хромофорными группами. Однако цепь конформационных превращений в молекуле может возникать не только в результате прямого воздействия квантов света, но и вследствие воздействия активных кислородных метаболитов, генерируемых при фотолизе воды.

Фотолиз воды, основанный на прямом распаде молекулы под воздействием квантов поглощаемого света, может происходить при устоянии поглощения энергии порядка 237,4 кДж/моль. Однако наибольшая эффективность этого процесса наблюдается в результате воздействия квантов света с длиной волны менее 400 нм что соответствует примерно 293 кДж/моль.

Но если процесс фотолиза воды рассматривать не до высвобождения конечных продуктов в виде молекулярных кислорода и водорода, а до образования активных форм кислорода, то величина энергетического барьера снижается до 1,23 эВ. В результате этого, под действием длинноволнового УФ-излучения могут запускаться каскады фотохимических реакций, оказывающие косвенное воздействие на белки. Это делает особо интересным изучение влияния этого участка спектрального диапазона на физико-химические характеристики альбумина, для разделения эффектов прямого и косвенного действия УФ-излучения.

Методом регистрации электронных спектров поглощения изучено влияние длинноволнового УФ-излучения на спектральные характеристики мономерной и димерной форм сывороточного альбумина быка. Показана неодинаковая фоточувствительность исследуемых форм биомакромолекулы.

Установлено, что вследствие отсутствия хромофоров, способных поглощать энергию квантов света с длиной волны около 365 нм, зарегистрированные нами фотоиндуцированные изменения в спектральных характеристиках белка позволяют выявить появление цепи конформационных превращений, индуцированных процессами его окислительной модификации белка вследствие образования активных форм кислорода, образующихся вследствие фотолиза воды.

**Ключевые слова:** вакуумное УФ-излучение, электронные спектры поглощения, сывороточный альбумин.

В процессе жизни у живых организмов постоянно увеличивается риск развития патологий, основной причиной возникновения которых является взаимодействие биополимеров с реакционно-способными свободно-радикальными продуктами [1-3], образующимися в организме как в результате протекания метаболических реакций, так и под действием внешних факторов, одним из которых является солнечное излучение.

В настоящее время исследования влияния оптического диапазона электромагнитных излуче-

ний на полимеры, белки и другие биологические материалы не только не потеряли актуальности, но и определяют развитие важнейших прикладных направлений [4-11].

Изучение действия внешних факторов на белки и ферменты представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной биофизики, а также экологии и медицины.

Фотолиз воды основан на прямом распаде ее молекулы воды под воздействием квантов поглощаемого света. Для прямого разрыва ковалентной связи в молекуле воды достаточно 237,4 кДж/моль. Однако наибольшая эффективность фотолиза воды наблюдается в результате воздействия на нее кван-

Колтаков И. А., Луковиков Д. Ю., Барилук А. Н., Карташова Ю. С., Гокбаева А. Я., Ливенцева С. Н., Артюхов В. Г.

тов света с длиной волны менее 400 нм, что соответствует примерно 293 кДж/моль [12].

Наиболее быстро этот процесс протекает в верхних слоях атмосферы в результате воздействия коротковолнового и вакуумного УФ-излучения в диапазоне длин волн от 240 и менее, однако поверхности земли такое жесткое излучение с энергией кванта более 3 эВ. практически не достигает, вследствие непрозрачности атмосферы в этом участке спектрального диапазона.

Вместе с тем, поверхности Земли достигают кванты света с энергией от 1.14 до 1.48 эВ, которые занимают участок спектрального диапазона в средне- и длинноволновой области УФ-спектра 300 – 400 нм [13]. Но если процесс фотолиза воды рассматривать не до высвобождения конечных продуктов в виде молекулярных кислорода и водорода, а до образования активных триплетных фотопродуктов и активных форм кислорода, то величина энергетического барьера снижается до 1.23 эВ [12].

Таким образом, под действием длинноволнового УФ-излучения могут запускаться каскады фотохимических реакций, высвобождающие активные формы кислорода, воздействующие на белки [14]. Это делает особо интересным изучение влияния этого участка спектрального диапазона длин волн на физико-химические характеристики белков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модели для проведения исследования, нами был выбран сывороточный альбумин быка (Sigma). Облучение образцов проводили с помощью установки VSE-UV (Россия), контроль дозы облучения осуществляли встроенным дозиметром облучателя. Температура в процессе фотомодификации поддерживалась с точностью до 0,1 °С криостатом LOIP FT-311-80 (Россия). Хроматографическую очистку и разделение мономерной и димерной фракции сывороточного альбумина быка проводили с помощью хроматографа GE Akta Pure (Швеция) на сефадексе G-100 (GE-H, США). Регистрацию электронных спектров поглощения осуществляли на спектрофотометре Shimadzu UV 2401-PC с шагом 0.2 нм и спектральной шириной щели 0.2 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 мм и 5 мм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы нами были зарегистрированы электронные спектры поглощения мономерной и димерной фракции сывороточного альбумина

быка. Было выявлено, что обе формы имеют различия в своих спектральных характеристиках. Так мономерный сывороточный альбумин имел ярко выраженные максимумы поглощения в области 196.6, 194.2 и 191.6 нм, характерные для пептидных связей и остатков фенилаланина [15]. У димерной формы полосы поглощения в этой области были диффузно сглажены, а максимумы оптической плотности были зафиксированы нами при длинах волн 192.0 и 198.4 нм (Рис. 1). В диапазоне длин волн от 200 до 295 нм уровень регистрируемого параметра для одной полипептидной цепи оказался ниже на 3-7%, чем для димерной формы белка.

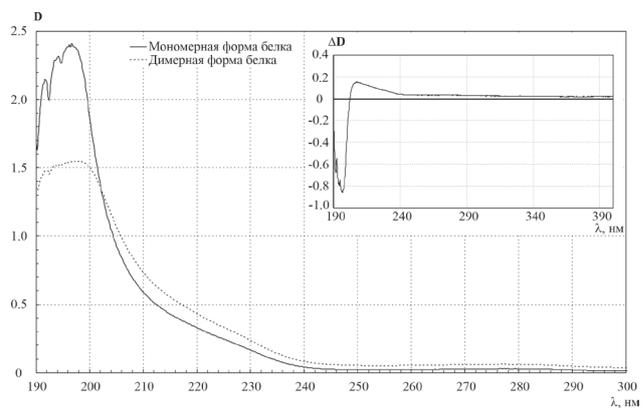


Рис. 1. Электронные спектры поглощения мономерной и димерной формы сывороточного альбумина быка (на вставке представлен дифференциальный спектр)

Для выявления роли в процессах фотомодификации сывороточного альбумина образующихся свободнорадикальных продуктов в результате УФ-индуцированного фотолиза воды, нами были проанализированы электронные спектры поглощения фотомодифицированных растворов белка. Анализ полученных данных показал, что димеры и мономеры по-разному реагируют на облучение (рис. 2).

Фотомодификация мономерного белка в дозе 7.4 – 37 кДж/м<sup>2</sup> вызывала снижение оптической плотности относительно контроля от 190 до 223.4 и 236.8 нм соответственно. Параллельно с этим наблюдалось увеличение регистрируемого показателя на 5-11% в области поглощения ароматических аминокислотных остатков 255 – 292 нм, что свидетельствует о возникновении ряда конформационных изменений в молекулах белка вследствие косвенного воздействия УФ-радиации, опосредованного активными кислородными метаболитами.

Облучение раствора белка в дозе 74 кДж/м<sup>2</sup> приводило к увеличению оптической плотности раствора белка во всем исследуемом диапазоне длин волн.

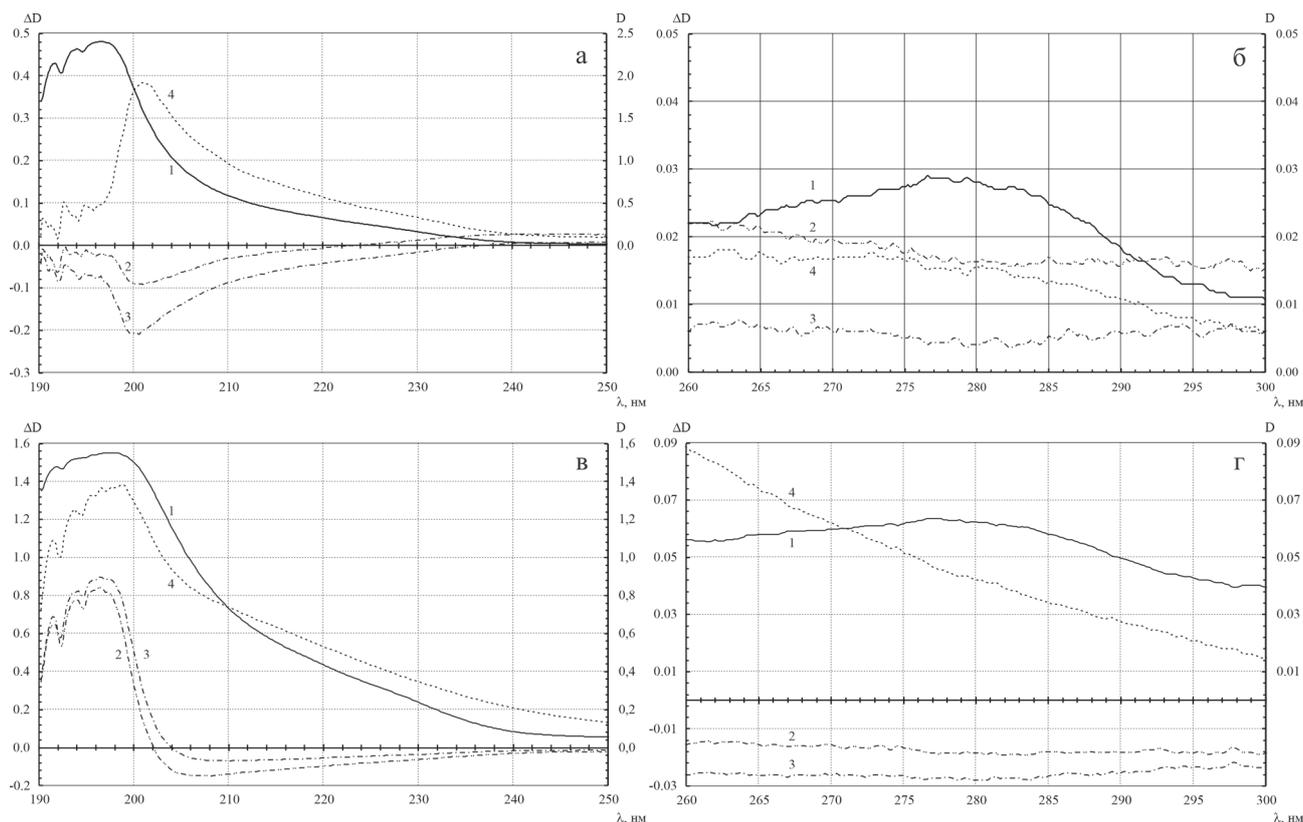


Рис. 2. Разностные электронные спектры поглощения мономерной (а, б) и димерной (в, г) формы сывороточного альбумина быка в условиях воздействия длинноволнового квазимонохроматического УФ-излучения  $\lambda_{max}$  365 нм. Обозначения: 1 - контроль, 2 - облучение в дозе 7.4 кДж/м<sup>2</sup>, 3 - облучение в дозе 37 кДж/м<sup>2</sup>, 4 - облучение в дозе 74 кДж/м<sup>2</sup>

Ответная реакция димеров сывороточного альбумина на фотомодификацию носила иной характер. Нами было выявлено увеличение оптической плотности облученного всеми используемыми дозами УФ-света на 2-5% в диапазоне длин волн от 190 до 207 нм.

Снижение регистрируемого параметра на 2-6 % было выявлено на участке спектра 210,4-248.6 нм только при использовании доз 7,4 и 37 кДж/м<sup>2</sup>. В области 260 – 290 нм только максимальная из используемых нами доз приводила к увеличению оптической плотности раствора белка. В остальных случаях снижение исследуемой величины составило около 3.8 %.

Таким образом, можно констатировать, что при действии УФ-излучения в области длин волн около 365 нм происходит образование активных кислородных метаболитов, оказывающих влияние на конформационные изменения молекул белка, которые находят подтверждение в процессах изменения интенсивности полос поглощения исследуемого белка. Отсутствие у молекул альбумина хромофоров, способных акцептировать свет с такой энергией кванта делает возможным прояв-

ление конформационных изменений в полипептидной цепи в результате фотоиндуцированной окислительной модификации белка.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скулачев В. П. // Соросовский образовательный журнал : журнал. 1999. № 9. С. 4-10.
2. Höhn A., Jung T., Grimm S., Grune T. // Free Radical Biology & Medicine. 2010. Vol. 48, №. 8. С. 1100–1108.
3. Höhn A., Weber D., Jung T., Ott C., Hugo M., Kochlik B., Kehm R., König J., Grune T., Castro J. // Redox Biology. 2017. Vol. 11. С. 673–681.
4. Колтаков И.А., Артюхов В.Г., Путинцева О.В. // Материалы XX съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова. 2007. С. 273.
5. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Колтаков И.А., Вдовина В.А. //Биофизика. 2009. Т. 54. № 2. С. 252-255.
6. Артюхов В.Г., Путинцева О. В., Вдовина В. А., Колтаков И. А., Пашков М. В., Василенко Д. В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 2. С. 258-263.
7. Колтаков И.А., Артюхов В.Г., Путинцева

Колтаков И. А., Луковиков Д. Ю., Барилук А. Н., Карташова Ю. С., Гокбаева А. Я., Ливенцева С. Н., Артюхов В. Г.

О.В. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 4. С. 73-81.

8. Наквасина М.А., Токмакова Е.В., Колтаков И.А., Артюхов В.Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 6. С. 592-598.

9. Нгуен В.Х., Артюхов В.Г., Колтаков И.А. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 2. С. 197-204.

10. Шилов С.В., Колтаков И.А., Леликова Е.Н., Артюхов В.Г. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. № 1. С. 97-101.

11. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Вдовина В.А., Колтаков И.А., Бычков М.Л. // Аллергология и иммунология. 2008. Т. 9. № 3. С. 360.

*Воронежский государственный университет  
Колтаков И. А., к.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии  
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru*

*Луковиков Д. А., студент кафедры биофизики и биотехнологии*

*Барилук А. Н., студент кафедры биофизики и биотехнологии*

*Карташова Ю. С., студент кафедры биофизики и биотехнологии*

*Гокбаева А. Я., магистрант кафедры биофизики и биотехнологии*

*Ливенцева С. Н., магистрант кафедры биофизики и биотехнологии*

*Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

12. Водород. Свойства, получение, хранение, транспортирование, применение: Справ. изд. / Д. Ю. Гамбург, В. П. Семенов, Н. Ф. Дубовкин, Л. Н. Смирнова; Под ред. Д. Ю. Гамбурга, Н. Ф. Дубовкина. М.: Химия, 1989. 672 с

13. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Наквасина М.А., Башарина О.В., Путинцева О.В., Шмелев В.П. Биофизика: Учебник для вузов. Москва, Екатеринбург: Академический Проект, Деловая книга, 2016. 295 с

14. Артюхов В. Г., Башарина О. В. // Радиационная биология. Радиоэкология, 2021, Т. 61, № 1, стр. 54-68

15. Мигович, М. И. , Кельман В. А. // Оптика и спектроскопия. 2014. Т. 117. № 2. С. 207.

*Voronezh State University  
Koltakov I. A., PhD, Associate Professor,  
Department of Biophysics and Biotechnology  
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru*

*Lukovikov D. A., student, Department of Biophysics and Biotechnology*

*Barilyk A. N., student, Department of Biophysics and Biotechnology*

*Kartashova Yu. S., student, Department of Biophysics and Biotechnology*

*Gokbaeva A. Ya., master, Department of Biophysics and Biotechnology*

*Liventseva S. N., master, Department of Biophysics and Biotechnology*

*Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor,  
Head. Department of Biophysics and Biotechnology  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

## **ANALYSIS OF SPECTRAL CHARACTERISTICS OF BOVINE SERUM ALBUMIN UNDER LONG-WAVE QUASI-MONOCHROMATIC UV EXPOSURE**

**I. A. Koltakov, D. Yu. Lukovikov, A. N. Barilyuk, Yu. S. Kartashova, A. Ya. Gokbaeva, S. N. Liventseva, V. G. Artyukhov**

*Voronezh State University*

**Abstract.** The impact of high-energy radiation on proteins is usually associated with the absorption of light energy by its chromophore groups. However, a chain of conformational transformations in a molecule

can arise not only as a result of the direct action of light quanta, but also as a result of the action of active oxygen metabolites generated during water photolysis.

Photolysis of water, based on the direct decomposition of the molecule under the influence of absorbed light quanta, can occur at an energy absorption of about 237.4 kJ/mol. However, the greatest efficiency of this process is observed as a result of exposure to light quanta with a wavelength of less than 400 nm, which corresponds to approximately 293 kJ/mol.

But if the process of water photolysis is considered not before the release of end products in the form of molecular oxygen and hydrogen, but before the formation of reactive oxygen species, then the energy barrier decreases to 1.23 eV. As a result, under the action of long-wavelength UV radiation, cascades of photochemical reactions can be triggered, which have an indirect effect on proteins. This makes it particularly interesting to study the influence of this part of the spectral range on the physicochemical characteristics of albumin, in order to separate the effects of direct and indirect effects of UV radiation.

The effect of long-wave UV radiation on the spectral characteristics of the monomeric and dimeric forms of bovine serum albumin was studied by recording electronic absorption spectra. The unequal photosensitivity of the investigated biomacromolecules is shown. It has been established that, due to the absence of chromophores capable of absorbing the energy of light quanta with a wavelength of about 365 nm, the photoinduced changes in the spectral characteristics of the protein recorded by us make it possible to reveal the appearance of a chain of conformational transformations induced by the processes of oxidative modification of the protein due to the formation of reactive oxygen species resulting from the photolysis of water.

**Keywords:** UV radiation, electronic absorption spectra, serum albumin.

## REFERENCES

1. Skulachëv V. P. Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal : zhurnal, 1999, № 9, S. 4-10.
2. Höhn A., Jung T., Grimm S., Grune T. Free Radical Biology & Medicine, 2010, Vol. 48, №. 8, S. 1100–1108.
3. Höhn A., Weber D., Jung T., Ott C., Hugo M., Kochlik B., Kehm R., König J., Grune T., Castro J. Redox Biology, 2017, Vol. 11, S. 673–681.
4. Koltakov I.A., Artyukhov V.G., Putintseva O.V. Materialy XX s"yezda Fiziologicheskogo obshchestva im. I.P.Pavlova, 2007, S. 273.
5. Aptyukhov V.G., Putintseva O.V., Koltakov I.A., Vdovina V.A. Biofizika, 2009, T. 54, № 2, S. 252-255.
6. Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Vdovina V.A., Koltakov I.A., Pashkov M.V., Vasilenko D.V. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya, 2011, T. 51, № 2, S. 258-263.
7. Koltakov I.A., Artyukhov V.G., Putintseva O.V. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2018, № 4, S. 73-81.
8. Nakvasina M.A., Tokmakova Ye.V., Koltakov I.A., Artyukhov V.G. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya, 2019, T. 59, № 6, S. 592-598.
9. Nguyen V. Kh., Artyukhov V.G., Koltakov I.A. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2018, № 2, S. 197-204.
10. Shilov S.V., Koltakov I.A., Lelikova Ye.N., Artyukhov V.G. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2014, № 1, S. 97-101.
11. Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Vdovina V.A., Koltakov I.A., Bychkov M.L. Allergologiya i immunologiya, 2008, T. 9, № 3, S. 360.
12. Vodorod. Svoystva, polucheniye, khraneniye, transportirovaniye, primeneniye: Sprav. izd. Pod red. D. Yu. Gamburga, N. F. Dubovkina, M.: Khimiya, 1989, 672 s
13. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Nakvasina M.A., Basharina O.V., Putintseva O.V., Shmelev V.P. Biofizika: Uchebnik dlya vuzov, Moskva, Yekaterinburg: Akademicheskii Proyekt, Delovaya kniga, 2016, 295 s
14. Artyukhov V. G., Basharina O. V. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya, 2021, T. 61, № 1, S. 54-68
15. Migovich, M. I., Kel'man V. A. Optika i spektroskopiya, 2014, T. 117, № 2, S. 207.