

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.03.078>

УДК 611.018.54:577.336:546.214

**В.Д. Зинченко¹, И.П. Горячая¹,
К.Н. Головина², А.Н. Кириенко², И.И. Топчий²**

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

² ГУ “Национальный институт терапии им. Л.Т. Малої НАМН Украины”, Харьков

E-mail: irynagor@gmail.com

Озониндуцированная хемилюминесценция уранина в присутствии плазмы крови

Представлено академиком НАН Украины А.Н. Гольцевым

Хемилюминесцентный ответ системы уранин—плазма крови на действие озона состоит из двух частей — короткой вспышки, длящейся около 5 с, и послесвечения, спадающего в течение 20—30 мин. Короткая вспышка объясняется хемилюминесценцией при прямом окислении уранина озоном, длительное послесвечение — переносом энергии на уранин от других химически активных частиц. Действие пероксида водорода или гидроксил-радикала на систему в процессе послесвечения не влияет на его интенсивность. Отсюда делается вывод, что перенос энергии на уранин происходит от синглетного кислорода, который может образовываться в результате реакций озона с органическими молекулами. Предполагается возможность генерации синглетного кислорода в результате запуска под действием озона других реакций, механизм которых требует дополнительных исследований.

Ключевые слова: хемилюминесценция, озон, флуоресцеин, уранин, плазма крови.

Флуоресцеин и его производные относятся к числу флуорофоров, которые по своим свойствам пригодны для медико-биологических исследований. Они обладают высоким квантовым выходом в водной среде, высоким коэффициентом экстинкции, мембранной проницаемостью и используются для исследования конформационной динамики и молекулярных взаимодействий в белках и ДНК [1, 2], для получения изображений [3], как флуоресцентные и хемилюминесцентные пробы на синглетный кислород [4].

Цель исследования заключалась в изучении продукции активных форм кислорода (АФК) в цельной крови и в плазме крови после воздействия озона с использованием динамической соли флуоресцеина — уранина (УР).

Материалы и методы. Использовали донорскую кровь человека, предоставленную Харьковской станцией переливания крови со сроком хранения не более 4 суток, в качестве антикоагулянта был использован 3,8 % цитрат натрия.

Плазму получали, собирая надосадоку после центрифугирования крови при 300 g в течение 5 мин.

© В.Д. Зинченко, И.П. Горячая, К.Н. Головина, А.Н. Кириенко, И.И. Топчий, 2017

Для получения отмытых от плазмы эритроцитов кровь центрифугировали 5 мин при 800g, удаляли плазму, осадок разводили 1:10 физиологическим раствором, центрифугировали при тех же условиях и удаляли надосадок.

Озон получали путем электролиза, пропуская газообразный кислород через разработанный нами озонатор [5] и растворяли барботированием озono-кислородной смеси через физиологический раствор (150 мМ хлорида натрия) при температуре тающего льда. Концентрацию растворенного озона определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Specord UV VIS (“Carl Zeiss”, Германия) по значению экстинкции на полосе Хартли [6].

Регистрацию хемилюминесценции производили с помощью разработанного нами хемилюминометра [7].

Озонированный физиологический раствор (ОФР) вводили дозированно в кювету люминометра с исследуемым биологическим материалом. Использовали УР и аскорбиновую кислоту квалификации х.ч. (“Sigma-Aldrich”, США), пероксид водорода квалификации х.ч. (“Гамма Хим”, Россия), сульфат железа (“Sigma-Aldrich”, США).

Для наблюдения хемилюминесценции в кювету хемилюминометра, содержащую от 0,5 до 1 мл незабуференного раствора 100 мкМ УР и 100–200 мкл плазмы крови, вводили с помощью дозатора от 0,2 до 1 мл ОФР. Концентрация растворенного озона в ОФР составляла 5–7 мг/л или $(1–1,4) \cdot 10^{-4}$ М. Исследования проводили при комнатной температуре без перемешивания. Наблюдалась хорошая воспроизводимость в серии из трех экспериментов для одного образца.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены осциллографические записи хемилюминесценции при введении ОФР в водный раствор флуоресцеина без плазмы и в присутствии плазмы крови человека.

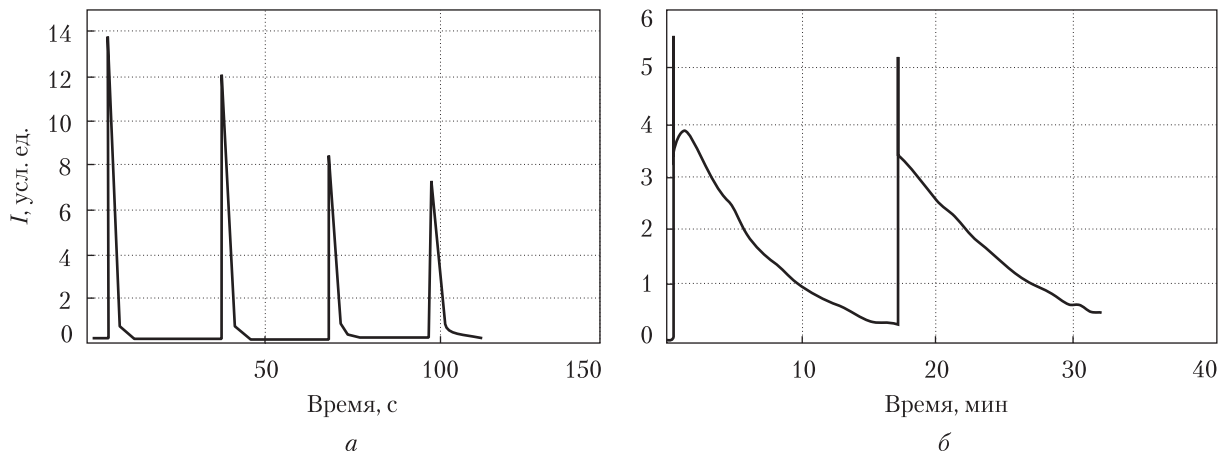


Рис. 1. Осциллографические записи озонстимулированной хемилюминесценции раствора УР. *а* – в отсутствие плазмы крови 500 мкл раствора УР (100 мкМ) последовательно вводили четыре порции ОФР по 500 мкл с концентрацией озона 120 мкМ; *б* – в кювету хемилюминометра, содержащую 500 мкл раствора УР (100 мкМ) и 200 мкл плазмы крови, вводили 500 мкл ОФР с концентрацией озона 120 мкМ и через 17 мин – повторно такое же количество ОФР

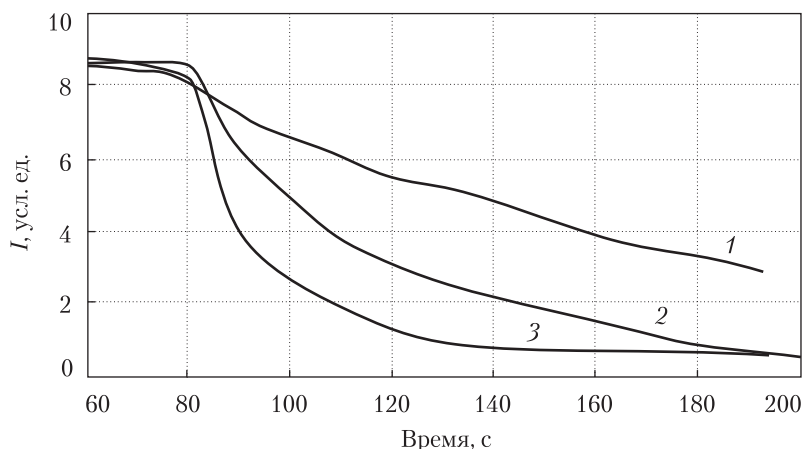


Рис. 2. Фрагменты записи озон-индуцированного послесвечения УР в присутствии плазмы крови человека после введения аскорбиновой кислоты в различных количествах. В 1 мл раствора УР (100 мкМ), содержащий 500 мкл плазмы крови, вводили 500 мкл ОФР (7 мг O_3 /л) и после возникновения послесвечения — аскорбиновую кислоту в количествах: 1 — 75 нМ; 2 — 0,75 мкМ; 3 — 7,5 мкМ

В отсутствие плазмы крови (см. рис. 1, а) в растворе флуоресцеина при введении озона наблюдается кратковременная вспышка хемилюминесценции длительностью около 5 с. При введении новых порций ОФР амплитуда вспышки снижается, что объясняется окислительной деструкцией молекулы УР под действием озона.

В присутствии плазмы крови человека (см. рис. 1, б) после введения озона возникает короткая вспышка хемилюминесценции и затем послесвечение, которое спадает через 20–30 мин. При повторном введении ОФР послесвечение возобновляется. Такое же послесвечение наблюдается в присутствии в растворе УР цельной крови. Однако в присутствии отмытых от плазмы эритроцитов при введении ОФР отмечается только короткая вспышка хемилюминесценции, а послесвечение не регистрируется. Аналогичный характер хемилюминесцентного ответа на озон мы наблюдали в экспериментах с другими видовыми формами крови — крысы и барана.

Полученные результаты показывают, что реакция исследуемой системы на озон может быть разделена на две части. Короткая вспышка хемилюминесценции связана с окислением молекулы УР и не зависит от присутствия биологического материала. Известно, что флуоресцеин, как и другие ксантеновые красители, люминесцирует в голубой части спектра при окислении озоном [8, 9]. Природа второй части хемилюминесцентного ответа системы на действие озона (послесвечение) требует дополнительных исследований. Рис. 2 иллюстрирует влияние аскорбиновой кислоты на интенсивность послесвечения.

Раствор аскорбиновой кислоты вводили в образец после запуска хемилюминесцентной реакции озоном. Падение интенсивности послесвечения при этом ускоряется тем сильнее, чем выше количество введенной аскорбиновой кислоты. Если после падения интенсивности послесвечения до нуля повторно вводить озон, то послесвечение имеет низкую интенсивность и быстро, в течение примерно 1 мин, затухает при дозах озона 75 нМ и 0,75 мкМ, а при дозе озона 7,5 мкМ не наблюдается.

На рис. 3 показано влияние пероксида водорода и ионов двухвалентного железа на интенсивность послесвечения. Условия эксперимента: в образце, содержащем 500 мкл раствора УР (100 мкМ) и 200 мкл плазмы крови, запустили хемилюминесцентную реакцию добавлением 500 мкл ОФР (7 мг O_3 /л) и после возникновения послесвечения ввели 1 мл

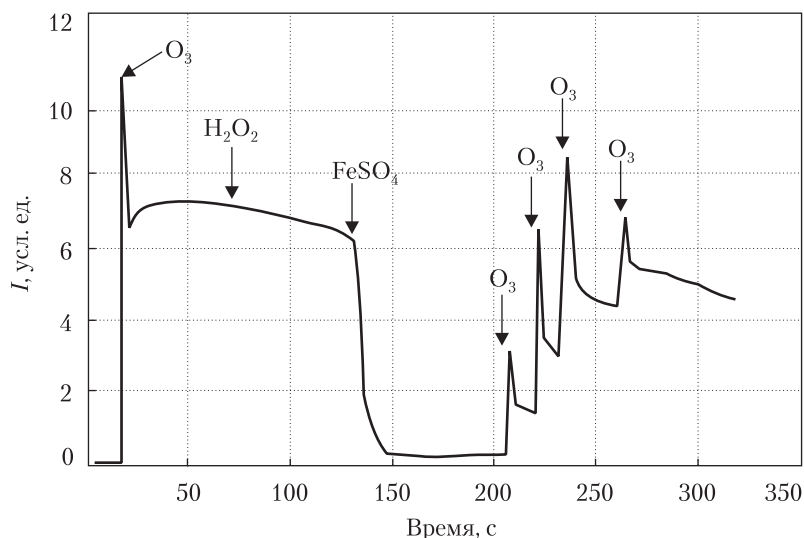


Рис. 3. Влияние пероксида водорода и ионов двухвалентного железа на интенсивность озониндуцированного послесвечения в системе УР—плазма крови. Условия проведения эксперимента описаны в тексте

раствора 1 мМ H_2O_2 (1 мМ), а через 2 мин — 1 мл раствора FeSO_4 (1 мМ), после спада интенсивности послесвечения до нуля стали вводить ОФР порциями по 200 мкл.

Как видно на рис. 3, пероксид водорода не влияет на интенсивность послесвечения и, вероятно, не принимает участия в реакциях, ответственных за него. Ионы двухвалентного железа вызывают снижение интенсивности послесвечения, однако повторное введение ОФР после спада интенсивности до нуля, в отличие от описанного выше эксперимента с аскорбиновой кислотой, приводит к возобновлению послесвечения.

Известно, что аскорбиновая кислота проявляет антиоксидантное действие, являясь как самостоятельным восстановителем, так и субстратом антиоксидантных ферментов, при этом происходит восстановление окисленной формы аскорбиновой кислоты (recycling) [10]. Мы полагаем, что после падения интенсивности послесвечения до нуля аскорбиновая кислота присутствует в образце, в результате чего при повторном введении ОФР озон нейтрализуется и реакция послесвечения не запускается.

В присутствии ионов Fe^{2+} протекает реакция Фентона, в результате которой ионы Fe^{2+} окисляются пероксидом водорода до ионов Fe^{3+} .



Образовавшиеся ионы трехвалентного железа не взаимодействуют с АФК и их присутствие не препятствует запуску реакции послесвечения озоном.

Однако обратим внимание на то, что в реакции (1) образуется гидроксил-радикал — весьма сильный окислитель. Если предположить, что послесвечение в описанных выше экспериментах связано с окислением УР, то следовало бы ожидать, что после введения в образец ионов Fe^{2+} интенсивность послесвечения возрастет, чего не наблюдается. Это дает основание исключить участие гидроксил-радикала в реакции послесвечения, как и пероксида водорода.

Известен ряд хемилуминесцентных систем, в которых свет излучается флуоресцеином, что связано с переносом энергии от других химически активных частиц, например от

синглетного кислорода [11], от люминола [12] и от сульфидов [13], причем сами молекулы флуоресцеина (или его производных) не претерпевают химических изменений. Экспериментальным доказательством этого служит тот факт, что спектры хемилюминесценции красителей в таких реакциях подобны их спектрам флуоресценции [14]. Флуоресцеин и его производные могут люминесцировать при окислении озоном или пероксидом водорода; эти процессы также связаны с переносом энергии, однако энергия переносится от окисленных форм красителей к не окисленным, которые затем излучают свет. По этой схеме протекает описанная выше реакция озона с УР в отсутствие плазмы крови.

Как показано выше, на интенсивность послесвечения в присутствии плазмы крови не влияют пероксид водорода и гидроксил-радикал — АФК, способные вызывать окисление органических соединений. Это дает основания полагать, что послесвечение не связано с излучением света молекулами УР в результате их окисления. Дополнительным аргументом служит то, что послесвечение возобновляется при повторном введении озона, откуда следует, что УР не был израсходован в ходе первого цикла хемилюминесцентной реакции. Таким образом, данные факты позволяют говорить о том, что послесвечение связано с переносом энергии на УР от других химически активных частиц.

Наиболее вероятным претендентом на роль такой химически активной частицы, по нашему мнению, может быть синглетный кислород, который образуется при реакциях озона с органическими молекулами [15].

Акцептором энергии от синглетного кислорода является дианион UR^{2-} [11]:



Тушение послесвечения ионами двухвалентного железа происходит в результате прямого окисления Fe^{2+} в реакции с O_3^- , протекающей одновременно с реакцией (1):



Однако, рассматривая такую схему развития послесвечения, следует учитывать, что взаимодействие озона с органическими веществами происходит очень быстро [5], поэтому реакция (2) возможна только в начальный момент после введения озона. Для объяснения длительного послесвечения следует предположить возможность запуска озоном других реакций, которые требуют дополнительных исследований.

Таким образом, хемилюминесцентный ответ системы уранин—плазма крови на действие озона состоит из двух частей — короткой вспышки, длящейся около 5 с, и послесвечения, спадающего в течение 20—30 мин. Короткая вспышка объясняется хемилюминесценцией при прямом окислении уранина озоном, длительное послесвечение — переносом энергии на уранин от других химически активных частиц. Действие пероксида водорода или гидроксил-радикала на систему в процессе послесвечения не влияет на его интенсивность. Отсюда делается вывод, что перенос энергии на уранин происходит от синглетного кислорода, который может образовываться в результате реакций озона с органическими молекулами. Предполагается возможность генерации синглетного кислорода в результате запуска под действием озона других реакций, механизм которых требует дополнительных исследований.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Togashi D.M., Ryder A.G. Assessing protein-surface interactions with a series of multi-labeled BSA using fluorescence lifetime microscopy and Förster energy resonance. *Biophys. Chem.* 2010. **152**, № 1–3. P. 55–64.
2. Stoltenburg R., Schubert T., Strehlitz B. In vitro selection and interaction studies of a DNA aptamer targeting protein A. *PLoS One*. 2015. **10**, № 7, e0134403.
3. Nagano T. Development of fluorescent probes for bioimaging applications. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2010. **86**. P. 837–846.
4. Tanaka K., Miura T., Umezawa N. et al. Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-Based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 2001. **123**. P. 2530–2536.
5. Зинченко В.Д., Голота В.И., Сухомлин Е.А. и др. Лабораторное оборудование для применения озоновых технологий в биологии и медицине. *Проблемы криобиологии*. 2005. **15**, № 4. С. 712–718.
6. Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н. Физическая химия озона. Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1998. 480 с.
7. Біоломінометр: Пат. 72111 Україна, МПК G01N 21/76. Заявл. 05.01.2012; Опубл. 10.08.2012.
8. Bowman R.L., Alexander N. Ozone-induced chemiluminescence of organic compounds. *Science*. 1966. **154**. P. 1454–1456.
9. Nikokavouras J., Vassilopoulos G., Perry A. Some aspects of ozone-induced chemiluminescence of xanthene dyes. III. Stoichiometry and the chemiluminescence spectrum. *Chim. Chron., New Ser.* 1975. **4**. P. 23–26.
10. Karniya I., Kate S. Studies of the chemiluminescence of several xanthene dyes.V. Blue emission from an excited state of a reaction product. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1970. **43**. P. 1287–1292.
11. Segawa T., Ishikawa H., Kamidate T., Watanabe H. Micelle-enhanced fluorescein chemiluminescence catalyzed by horseradish peroxidase for the determination of hydrogen peroxide. *Analyt. Sci.* 1994. **10**. P. 589–593.
12. Diaz A.N., Garcial J.A.G., Lovillo J. Enhancer Effect of fluorescein on the luminol–H₂O₂–horseradish peroxidase chemiluminescence: energy transfer process. *J. Biolum. Chemilum.* 1997. **12**. P. 309–314.
13. Burguera J.L., Townshend A. Determination of ng/ml levels of sulphide by a chemiluminescent reaction. *Talanta*. 1980. **27**. P. 309–314.
14. Kamita I., Ivaki R. Studies of the chemiluminescence of several xantene dues. II. The chemiluminescence emission spectra of uranine and eosine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1966. **39**. P. 254–269.
15. Kanoffsky J.K., Sima P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.* 1991. **266**, № 14. P. 9039–9042.

Поступило в редакцию 22.09.2016

REFERENCES

1. Togashi, D. M. & Ryder, A. G. (2010). Assessing protein-surface interactions with a series of multi-labeled BSA using fluorescence lifetime microscopy and Förster energy resonance. *Biophys. Chem.*, 152, No. 1-3, pp. 55-64.
2. Stoltenburg, R., Schubert, T. & Strehlitz, B. (2015). In vitro selection and interaction studies of a DNA aptamer targeting protein A. *PLoS One*, 10, No. 7, e0134403.
3. Nagano, T. (2010). Development of fluorescent probes for bioimaging applications. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, 86, pp. 837-846.
4. Tanaka, K., Miura, T., Umerawa, N., Urano Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. & Nagano, T. (2001). Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-Based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, pp. 2530-2536.
5. Zinchenko, V. D., Golota, V. I., Sukhomlin, E. A. et al. (2005). Laboratory equipment for the application of ozone technology in biology and medicine. *Problemy kriobiologii*, 15, No. 4, pp. 712-718 (in Russian).
6. Lunin, V.V., Popovich, M.P., & Tkachenko, S.N. (1998). Physical chemistry of ozone. Moscow: Izd-vo Mosk. Univ. (in Russian).
7. Pat. 72111 UA, IPC G01n21/76. Bioluminometer, Zinchenko, V. D., Horiacha, I. P., Hovor, I. V., Publ. 10.08.2012 (in Ukrainian).
8. Bowman, R. L. & Alexander, N. (1966). Ozone-induced chemiluminescence of organic compounds. *Science*, 154, pp. 1454-1456.

- Nikovavouras, J., Vassilopoulos, G. & Perry, A. (1975). Some aspects of ozone-induced chemiluminescence of xanthene dyes. III. Stoichiometry and the chemiluminescence spectrum. *Chim. Chron., New Ser.*, 4, pp. 23-26.
- Karniya, I. & Kate, S. (1970). Studies of the chemiluminescence of several xanthene dyes. V. Blue emission from an excited state of a reaction product. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 43, pp. 1287-1292.
- Segawa, T., Ishikawa, H., Kamidate, T. & Watanabe, H. (1994). Micelle-enhanced fluorescein chemiluminescence catalyzed by horseradish peroxidase for the determination of the hydrogen peroxide. *Analyt. Sci.*, 10, pp. 589-593.
- Diaz, A. N., Garsial, J. A. G. & Lovillo, J. (1997). Enhancer Effect of fluorescein on the lumion-H₂O₂-horseradishperoxidase chemiluminescence: energy transfer process. *J. Biolum. Chemilum.*, 12, pp. 309-314.
- Burguerra, J. L. & Townshend, A. (1980). Determination of ng/ml levels of sulphide by a chemiluminescent reaction. *Talanta*, 27, pp. 309-314.
- Kamita, I. & Ivaki, R. (1966). Studies of the chemiluminescence of the several xantene dues. II. The chemiluminescence emission spectra of uranine and eosine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 39, pp. 254-269.
- Kanoffsky, J. K. & Sima, P. (1991). Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.*, 266, No. 14, pp. 9039-9042.

Received 22.09.2016

В.Д. Зінченко¹, І.П. Горячая¹, К.М. Головіна², А.М. Кірієнко², І.І. Топчий²

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

² ДУ "Національний інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України", Харків

E-mail: irynagor@gmail.com

ОЗОНІНДУКОВАНА ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЯ УРАНІНУ ЗА НАЯВНОСТІ ПЛАЗМИ КРОВІ

Хемілюмінесцентна відповідь системи уранін—плазма крові на дію озону складається з двох частин — короткого спалаху, що триває близько 5 с, і післясвітіння, яке спадає протягом 20 — 30 хв. Короткий спалах пояснюється хемілюмінесценцією в разі прямого окиснення ураніну озоном, тривале післясвітіння — перенесенням енергії на уранін від інших хімічно активних частинок. Дія пероксиду водню і гідроксилрадикалу на систему в процесі післясвітіння не впливає на його інтенсивність. Звідси робиться висновок, що перенесення енергії на уранін відбувається від синглетного кисню, який може утворюватися внаслідок реакцій озону з органічними молекулами. Припускається можливість генерації синглетного кисню внаслідок запуску під дією озону інших реакцій, механізм яких потребує додаткових досліджень.

Ключові слова: хемілюмінесценція, озон, флуоресцеїн, уранін, плазма крові.

V.D. Zinchenko¹, I.P. Goriacha¹, K.N. Golovina², A.N. Kiriychenko², I.I. Topchiiy²

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

² L.T. Malaya National Therapy Institute of the Academy of NAMS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: irynagor@gmail.com

OZONE-INDUCED CHEMILUMINESCENCE OF URANINE IN THE PRESENCE OF BLOOD PLASMA

Chemiluminescent response of the "uranine-blood plasma" system to the effect of ozone consists of two parts, i.e. a gentle flash lasting about 5 seconds and the afterglow, falling within 20-30 min. The short burst is explained by chemiluminescence at the direct oxidation of uranine with ozone, and the long afterglow is done by the energy transfer to uranine from other reactive species. The action of hydrogen peroxide or a hydroxyl radical on the system in the process of afterglow does not influence its intensity. Hence, the conclusion is made that the transfer of energy to uranine is derived from singlet oxygen. However, it does not rule out the possibility of the afterglow by the triggering of other reactions under the influence of ozone, whose mechanism requires a further research.

Keywords: chemiluminescence, ozone, fluorescein, uranine, blood plasma.