

Механизмы взаимодействия гидроксильных,  
гидропероксильных радикалов  
и УФ-С излучения с аминокислотами и белками.

Доклад вед.научн.сотр. Пискарева И.М., вед.спец. Ушканова  
В.А., доц. Аристовой Н.А., проф. Ивановой И.П.

# Газоразрядная плазма

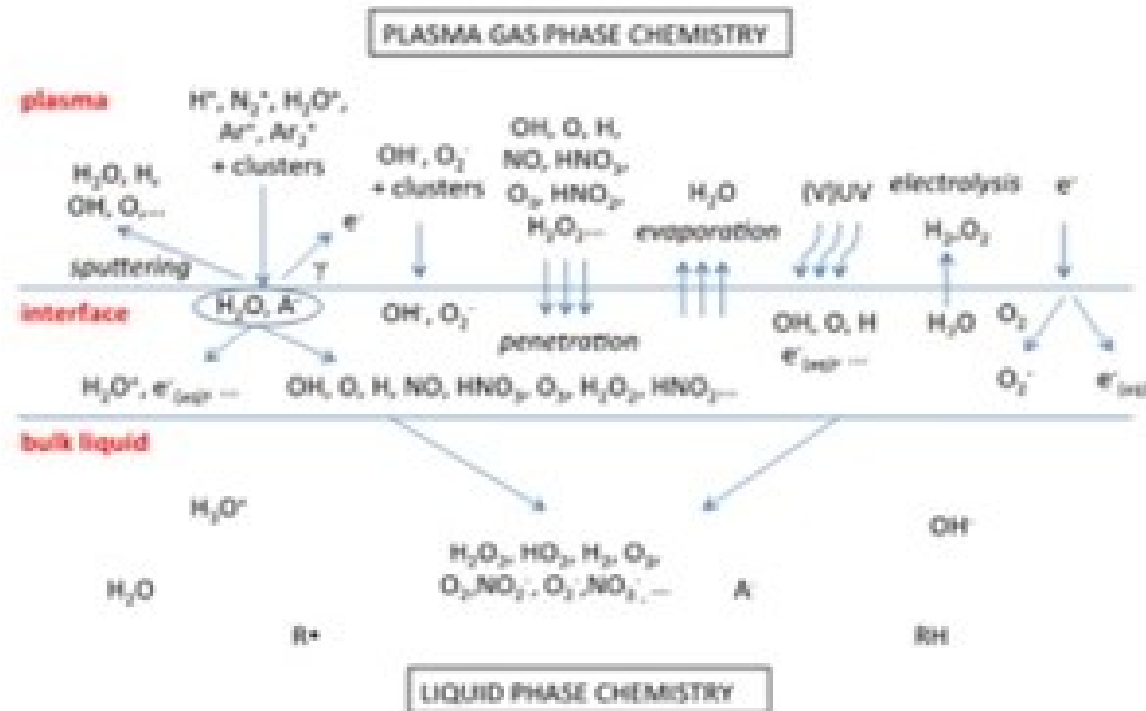


Figure 1. Schematic diagram of some of the most important species and mechanisms for an air/plasma air plasma in contact with water.

# Реакция Фентона

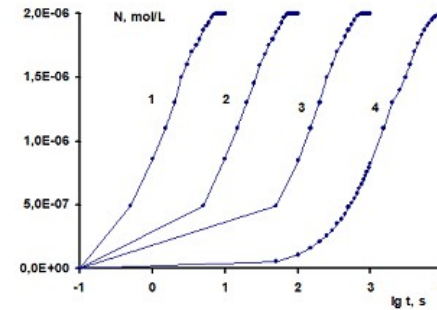
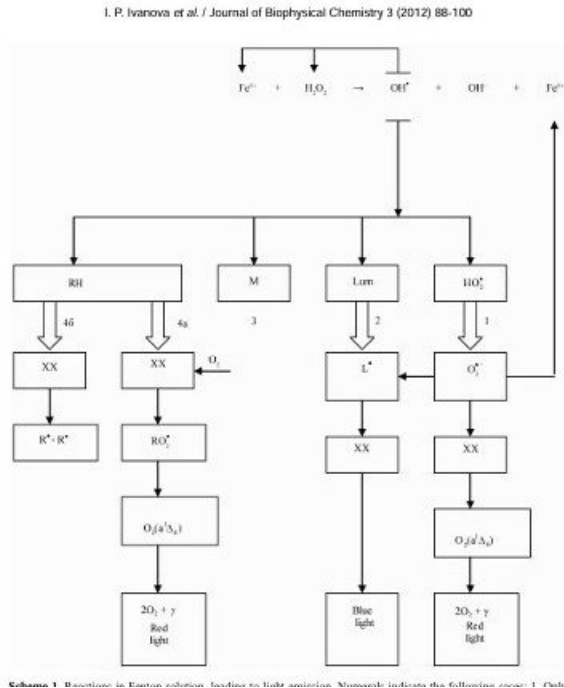


Рисунок 1. Выход окисления  $\text{Fe}^{2+}$  при  $[\text{Fe}^{2+}] > [\text{H}_2\text{O}_2]$ . N(моль/л) – количество актов окисления ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) за время t(c) при pH = 2 и разных концентрациях  $\text{Fe}^{2+}$ , в зависимости от времени после смешивания реагентов t(c). Концентрация реагентов:  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-6}$  моль/л;  $[\text{Fe}^{2+}]$ : 1 –  $10^{-2}$ ; 2 –  $10^{-3}$ ; 3 –  $10^{-4}$ ; 4 –  $10^{-5}$  моль/л. Постоянная концентрация перекиси и разные концентрации железа.

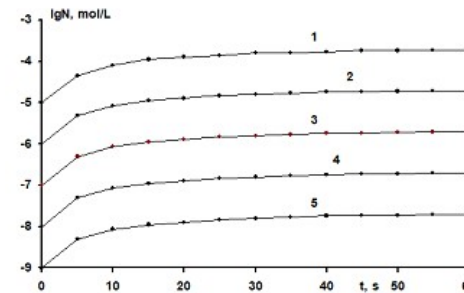
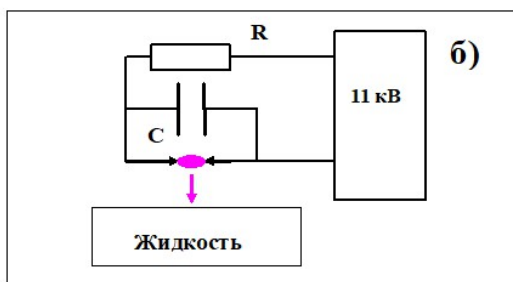
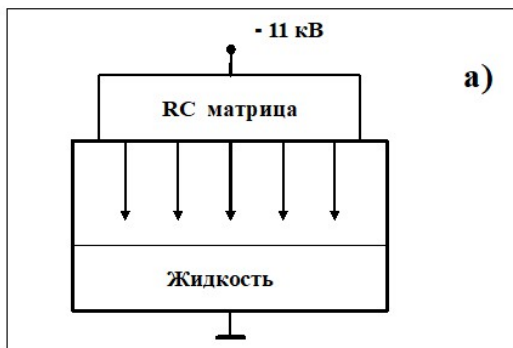


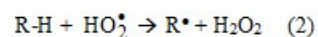
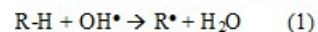
Рисунок 2. Выход окисления  $\text{Fe}^{2+}$  при  $[\text{Fe}^{2+}] > [\text{H}_2\text{O}_2]$ . N(моль/л) – количество актов окисления ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) в зависимости от времени после смешивания реагента t(c), pH = 2. Концентрации реагентов:  $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$  моль/л;  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ : 1 –  $10^{-4}$ , 2 –  $10^{-5}$ , 3 –  $10^{-6}$ , 4 –  $10^{-7}$ , 5 –  $10^{-8}$  моль/л. Постоянная концентрация железа и разные концентрации перекиси.

# Генерирование свободных радикалов



Радикалы  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ . В реакции органических соединений с радикалами на

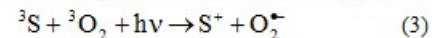
первой стадии происходит отрыв атома водорода от молекулы-мишени [12].



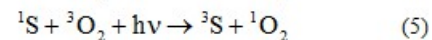
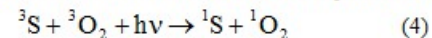
Здесь R – любой органический радикал, включающий фрагменты аминокислот или белков. В этих реакциях выделяется энергия, которая может расходоваться на отрыв атома водорода от молекулы-мишени. В реакции (1) выделяется энергия ~480 кДж/моль, в реакции (2) ~368 кДж/моль. Энергия связи атома водорода, соединенного с  $\alpha$ -атомом углерода ароматической аминокислоты составляет 360 – 380 кДж/моль. Для остальных атомов углерода энергия связи C-H составляет 430 – 450 кДж/моль [13].

УФ-излучение

В реакциях типа I водорастворимый фото-сенсibilизатор в триплетном состоянии  $^3\text{S}$  под действием фотона взаимодействует с молекулой кислорода, которая также находится в основном триплетном состоянии. В результате образуется ион-радикал  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .



В реакции типа II фото-сенсibilизатор в триплетном или синглетном состоянии под действием фотона вступает в реакцию с молекулой кислорода, которая находится в основном триплетном состоянии. При этом образуется синглетный кислород  $^1\text{O}_2$  [17].



Фотодеструкция через реакции типа I и II наблюдалась экспериментально в большом числе работ. Но для того, чтобы механизм фотодеструкции через хромофоры был заметным, интенсивность света должна быть большой (около 30 000 люкс), мощность лампы должна быть порядка 300 Вт и время обработки должно быть порядка 10 – 20 часов

# Коэффициент Штерна-Фольмера

Для описания процесса статического тушения флуоресценции, происходящего при введении в раствор веществ, подавляющих флуоресценцию, в работе Stern-Volmer (1919) было предложено использовать выражение (2).

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

Где  $[Q]$  – концентрация вещества-тушителя,  $I_0$  and  $I_Q$  интенсивность флуоресценции пробы раствора до и после введения тушителя соответственно. Ослабление флуоресценции зависит от концентрации тушителя  $[Q]$  и величины коэффициента  $K_{SV}$ , который принято называть коэффициентом Штерна-Фольмера. Вместо концентрации тушителя берем дозу  $D$ . Рассмотрим соотношения для этого коэффициента в случаях, когда вещество расходуется либо образуется в реакции с активными частицами.

## Вещество расходуется.

В начальной стадии, когда израсходовано мало исходного вещества, закон уменьшения флуоресценции может быть выражен в виде:

$$F_D = F_0 e^{-DK_{SV}^0} \quad (3)$$

Где  $F_0$  – флуоресценция исходной пробы,

$F_D$  – флуоресценция той же пробы после реакции с активными частицами, доза  $D$ .

$K_{SV}^0$  – начальное значение коэффициента Штерна-Фольмера при дозе  $D \sim 0$ .

Рассмотрим приближенное соотношение:

$$\frac{F_0}{F_D} = \frac{F_0}{F_0 \cdot e^{-DK_{SV}^0}} = e^{DK_{SV}^0} \sim 1 + DK_{SV}^0 \quad (4)$$

Соотношение (4) выполняется при малых дозах,  $DK_{SV}^0 < 0.1$  и позволяет находить значение  $K_{SV}^0$ .

**Вещество образуется.** Рассмотрим случай, когда вещество образуется и накапливается, флуоресценция увеличивается. В пробе имеется фоновая флуоресценция  $F_0$ . Тогда при малых  $DK_{SV}^0$

$$F_D = F_0 e^{DK_{SV}^0} \quad (5)$$

$$\frac{F_D}{F_0} = e^{DK_{SV}^0} \sim 1 + DK_{SV}^0 \quad (6)$$

Здесь пренебрегается расходом образующегося вещества под действием активных частиц, так как концентрация вещества в начальный момент мала. Выражения (4) и (6) одинаковы, они характеризуют зависимость от свойств источника АФК выхода флуоресценции пробы, пропорционального дозе, как в случае расходования исходного вещества, так и образования нового. Размерность коэффициента  $K_{SV}^0$  – относительное изменение флуоресценции продукта, нормированное на дозу в единичном объеме пробы. Коэффициент  $K_{SV}^0$  характеризует степень воздействия на флуоресценцию исследуемого вещества физического фактора, создающего в растворе дозу  $D$ .

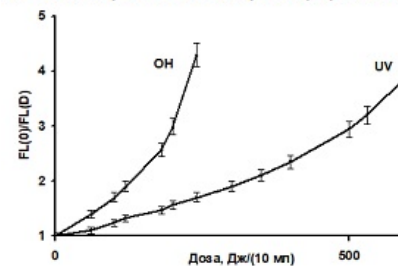


Рисунок 1. Зависимость относительного изменения флуоресценции раствора триптофана  $FL(0)/FL(D)$ , где  $FL(0)$  – флуоресценция исходной пробы,  $FL(D)$  – флуоресценция той же пробы после воздействия на пробу активными частицами дозой  $D$ , создаваемой радикалами  $OH^*$  (плазма) и УФ лампой.

# Грам-положительные и Грам-отрицательные бактерии

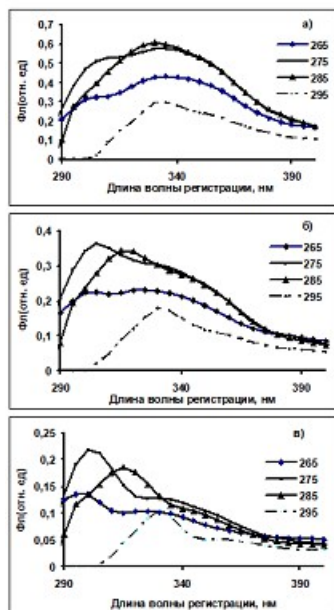


Рисунок 1. Флуоресценция грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*. Выход флуоресценции Фл(отн. ед) – относительные единицы, в зависимости от длины волны регистрации при длинах волн возбуждения 265, 275, 285 и 295 нм. Длины волн возбуждения, нм, обозначены на рисунках справа от графиков. Анализировались пробы: а) – исходная необработанная проба; б) и в) – пробы после реакции с гидроксильными радикалами, дозы 240 и 600 Дж/(10 мл) соответственно.

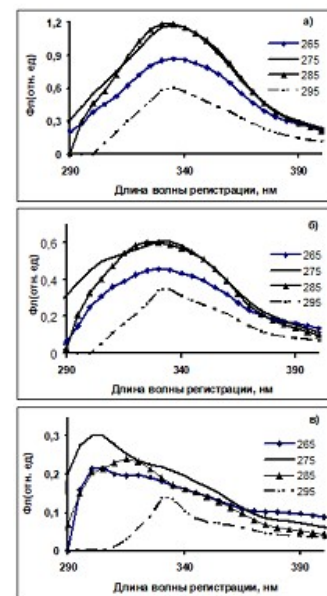
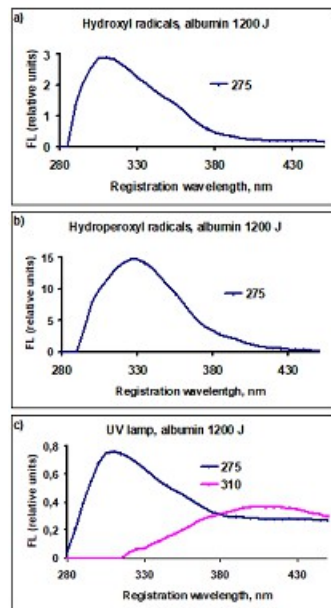
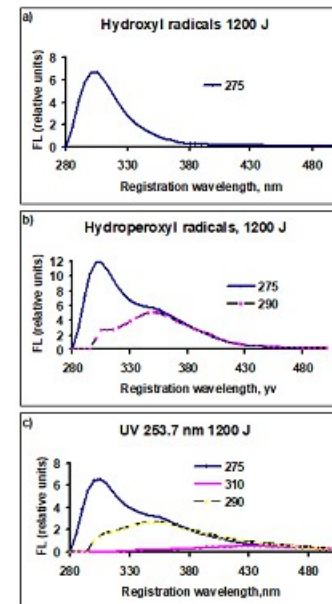


Рисунок 2. Флуоресценция грамотрицательных бактерий *Leminorella richardii*. Выход флуоресценции Фл(отн. ед) – относительные единицы, в зависимости от длины волны регистрации при длинах волн возбуждения 265, 275, 285 и 295 нм. Длины волн возбуждения, нм, обозначены на рисунках справа от графиков. Анализировались пробы: а) – исходная необработанная проба; б) и в) – пробы после реакции с гидроксильными радикалами, дозы 240 и 600 Дж/(10 мл) соответственно.

# Многофотонное возбуждение больших молекул



**Figure 4.** Dependence of the fluorescence yield of bovine serum albumin solutions, FL (relative units) on the registration (emission) wavelength, nm, treated with active species, dose  $1200 \text{ J}(10 \text{ mL})^{-1}$ : a) – cold plasma generator,  $\text{OH}^\bullet$  radicals; b) – hot plasma generator, radicals  $\text{HO}_2^\bullet$ ; c) – UV lamp radiation  $\lambda = 237.3 \text{ nm}$ . The numbers on the right side of each graph: excitation wavelengths, nm. The red line – the formed dityrosine.



**Figure 5.** The dependence of the fluorescence yield of amino acid solutions, similar in composition to bovine serum albumin, FL (relative units) on the registration (emission) wavelength, nm, treated by active species, dose  $1200 \text{ J}(10 \text{ mL})^{-1}$ : a) – cold plasma, radicals  $\text{OH}^\bullet$ ; b) – pulse plasma radiation, radicals  $\text{HO}_2^\bullet$ ; c) – UV radiation  $\lambda = 237.3 \text{ nm}$ . The numbers on the right of each graph: excitation wavelengths, nm.

# Механизм действия стенки бактерии

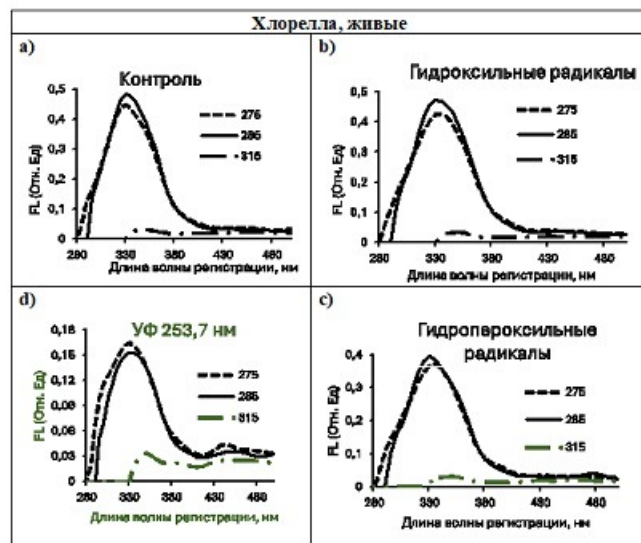


Рисунок 2. Флуоресценция живой хлореллы,  $F_I$  (относительные единицы) в зависимости от длины волны регистрации, нм, при длинах волн возбуждения 275, 285 и 315 нм (подписаны справа на каждом рисунке). а) – контроль (необработанная проба); б), с), d) – обработка дозой  $700 \text{ Дж} (10 \text{ мл})^{-1}$  б) - гидроксильные радикалы, с) – гидропероксильные радикалы, d) – УФ-С излучение.

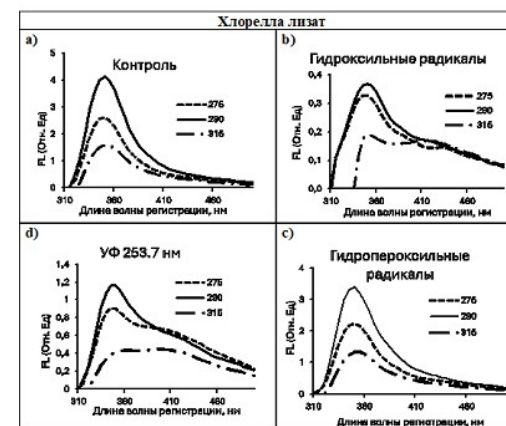
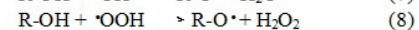
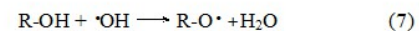
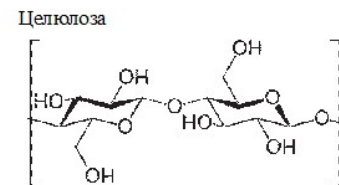


Рисунок 3. Флуоресценция лизата хлореллы,  $F_I$  (относительные единицы) в зависимости от длины волны регистрации, нм, при длинах волн возбуждения 275, 285 и 315 нм (подписаны справа на каждом рисунке). а) – контроль (необработанная проба); б), с), d) – обработка дозой  $700 \text{ Дж} (10 \text{ мл})^{-1}$  б) - гидроксильные радикалы, с) – гидропероксильные радикалы, d) – УФ-С излучение.



**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ**