18-33-00940 «Фотоокисление в сложно организованных молекулярных системах: химическое картирование локализации продуктов превращения и интермедиатов»

Аннотация

Известно, фотоокисления липофусциновых (ЛГ) что продукты И меланолипофусциновых (МЛГ) гранул обладают флуоресценцией при возбуждении светом. При исследовании кинетической зависимости интенсивности флуоресценции от длительности облучения были обнаружены области спектральные последовательного роста интенсивности флуоресценции, относящиеся к образовавшимся в процессе продуктам фотоокисления. Также были обнаружены области, в которых интенсивность флуоресценции растет до определенного момента (20-40 минут облучения), а затем уменьшается. Вероятно, подобное поведение следует приписать интермедиату реакции фотоокисления, накапливающемуся в первые минуты, а затем переходящему в продукт. Следует обратить внимание на то, что подобное поведение характерно как для ЛГ, так и МЛГ при облучении светом разного спектрального состава. Был использован как «белый» свет имитирующий естественное дневное освещение, так и «синий» свет с длинной волны 450 нм. Кроме того, было выявлено, что облучение лазером с длиной волны 790 нм приводит к сдвигу флуоресценции ЛГ и МЛГ в красную область, тогда как окисление надпероксидом калия приводит к сдвигу флуоресценции в синюю область. Таким образом, был сделан вывод о воздействия окислительного разном механизме И неприменимости надпероксида калия в качестве модельной системы для фотоокислений.

Впервые были изучены кинетические характеристики процессов фотоокисления в ЛГ и МЛГ методами ToF-SIMS (времяпролетная массспектрометрия вторичных ионов) и CARS (фемтосекундная антистоксовая рамановская спектроскопия). Для данных методов были разработаны методики пробоподготовки, позволившие провести исследования кинетических характеристик при фотоокислении гранул. На масс-спектрах, были обнаружены пики ионов, интенсивность ряда чья сначала увеличивается – сигнал достигал максимального значения при 20-минутном облучении, а затем уменьшался. Эти данные коррелируют с кинетическими кривыми, полученными методом флуоресцентной спектроскопии, что позволяет отнести данные пики к интермедиатам реакции фотоокисления (или их фрагментам). Кроме того, были обнаружены пики, соответствующие продуктам фотоокисления. Было показано разрушение Витамина Е под воздействием света с различными спектральными параметрами. При помощи CARS было обнаружено увеличение сигнала колебательных полос, характеризующих С=О колебания альдегидов на 30-40%.

Заявленные цели Проекта на период, на который предоставлен грант

Первый год. Исследование липофусциновых и меланолипофусциновых гранул.

1) Разработка протоколов пробоподготовки препаратов гранул для анализа методами ToF-SIMS, CARS и флуоресцентной спектроскопии. Разработка методов анализа спектров с целью выявления образования продуктов фотоокисления биомолекул.

2) Получение кинетических характеристик процессов образования продуктов фотоокисления и промежуточных интермидиатов реакции в липофусциновых и меланолипофусциновых гранулах методами CARS и флуоресцентной спектроскопии.

3) Исследование продуктов фотоокисления и ИХ локализации В липофусциновых и меланолипофусциновых гранулах, методами ToF-SIMS и CARS. Будут изучены как нативные гранулы, так и подвергнутые дополнительному облучению. Будут выявлены различия, вызванные облучением гранул (изменение интенсивностей сигнала продуктов и их локализации). Будет установлено влияние параметров облучения на протекание процессов фотоокисления.

Полученные за период, на который предоставлен грант, результаты с описанием методов и подходов, использованных при реализации Проекта (описать, уделив особое внимание степени оригинальности и новизны)

Фотоповреждающее воздействие света, образование липофусциновых (ЛГ) и меланолипофусциновых гранул (МЛГ).

Выделяют два класса фотоповреждающего воздействия света у человека. При сравнительно низких интенсивностях светового потока и длительном воздействии повреждаются фоторецепторы, при более высоком уровне интенсивности – клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ), а затем сетчатки. Считается, что наибольшую опасность представляет яркий свет в ультрафиолетовой и синей областях спектра. Однако глаз обладает рядом механизмов защиты, основным из которых является обновление фоторецепторных мембран и всего наружного сегмента зрительной клетки (палочки, и колбочки). Процесс обновления заключается в образовании новых мембран, взамен «старых», которые фагоцитируются клетками пигментного эпителия. В процессе «переваривания» мембран, бывают сбои, что приводит к образованию липофусциновых гранул. К 40 годам жизни ЛГ могут занимать до 8% цитоплазматического объема клетки РПЭ, а к 80 года процент увеличивается до 19% [1]. Другим защитным механизмом являются органеллы меланосомы (названы так, поскольку содержат эумеланин) присутствующие в клетках РПЭ. В возрастной группе до 20 лет меланосомы занимают ~ 8% [2], однако затем их количество снижается, при этом накапливаются меланолипофусциновые гранулы.

Пробоподготовка препаратов ЛГ и МЛГ.

ЛГ и МЛГ были выделены из РПЭ глаз кадавра. Разделение гранул было произведено путем центрифугирования, при этом образовывались три фракции: меланосомы, МЛГ и ЛГ. Отмывка образцов гранул производилась путем центрифугирования в дистиллированной воде (несколько раз).

Одной из модельных систем для окисления (не фотоокисления) ЛГ и МЛГ считается надпероксид калия. В рамках данной работы было проведено сопоставление контрольных, химически окисленных и фотооблученных гранул. Для приготовления химически окисленных гранул добавлялось 4-5 мг сухого надпероксида калия. Гранулы инкубировались в течение 10 мин, затем отмывались несколько раз путем центрифугирования в дистиллированной воде. Следует отметить, что гранулы имеют тенденцию к агрегации, поэтому во-время проведения анализа образец необходимо регулярно встряхивать или использовать магнитную мешалку.

Флуоресцентная микроскопия гранул проводилась, как в растворе, так и для высушенной пленки. Для получения высушенной пленки 20 мкл разведенного в 5 раз раствора (для получения заданной оптической плотности) наносилось на поверхность предварительно обезжиренного покровного стекла. Аналогичная процедура использовалась и для получения пленок для ToF-SIMS-анализа.

Для фемтосекундной антистоксовой рамановской спектроскопии (CARS) использование высушенной пленки оказалось неприемлемо, ввиду малой толщины полученной пленки (недостаточно вещества). Использование стандартных кювет также недопустимо из-за конструкции установки. Поэтому была разработана специальная кювета на основе двух покровных стекол и клейкой ленты (Scotch). Четыре стороны покровного стекла обклеивались тонкими полосками клейкой ленты. В результате в центре образовывалось небольшое углубление глубиной в толщину клейкой ленты (~100 мкм). Второе стекло накрывает углубление, препятствуя испарению жидкости. Полученного объема достаточно для длительной работы с образцом.

Флуоресцентная спектроскопия ЛГ и МЛГ в пленках.

Высушенные пленки ЛГ и МЛГ облучались фемтосекундными импульсами света (длина волны – 790 нм, мощность – 15 мВт). На рис. 1 и 2 показаны спектры флуоресценции супернатанта липофусциновых ИЗ И меланолипофусциновых гранул. Исследовались три образца: контроль, образец, окисленный надпероксидом калия, и образец, облученный 790 нм. Сравнение образцов облученных И химически окисленных гранул представляет интерес, поскольку при облучении образуется синглетный кислород, супероксидный анион и перекись водорода [3, 4].



Рис. 1. Спектры флуоресценции липофусциновых гранул.

На рис. 1 видно, что спектр контрольных МЛГ (темно-красный) и ЛГ (хаки) несколько отличается по форме, но максимумы примерно совпадают. Окисление надпероксидом калия (оранжевый график на рисунке) приводит к сдвигу флуоресценции ЛГ в синюю область, тогда как облучение светом (зеленый график) – наоборот, в красную. Аналогичная картина наблюдается и для МЛГ (рис. 2). Таким образом, было показано, что окисление надпероксидом и облучение приводит к разным изменениям состава, следовательно, нельзя считать химическое окисление удачной моделью фотоокислительных процессов.



Рис. 2. Спектры флуоресценции меланолипофусциновых гранул.

Флуоресцентная спектроскопия ЛГ и МЛГ в жидкости.

Образцы ЛГ и МЛГ подвергались облучению светодиодом с цветовой температурой 6500 К. Свектр излучения данного светодиода представлен на рис. 3. Мощность излучения составила 0,2 Вт/см².



Рис. 3. Спектр излучения светодиода, использовавшегося для облучения гранул.

Было использовано 2 вида излучения: «белый» свет (без светофильтра) и «синий» свет с использованием светофильтра, пропускающего λ < 500 нм.

Флуоресценция измерялась при возбуждении на длинах волн 355 нм, 430 нм и 450 нм, исходя из литературных данных [5, 6]. На рис. 4 показаны спектры флуоресценции ЛГ.



Рис. 4. Спектры флуоресценции ЛГ при возбуждении на 355 нм и 450 нм. И облучении «белым» светом.

Для ряда длин волн наблюдается монотонный рост флуоресценции с увеличением длительности облучения (например, для длины волны 460 нм). Скорее всего, данные длины волн соответствуют продуктам фотоокисления. Наблюдается также и другое поведение флуоресценции, например, в диапазоне 540-620 нм. Сперва интенсивность флуоресценции возрастает, достигая максимума на 20 минутах облучения, а затем начинает уменьшаться. Такое поведение может соответствовать интермедиатам реакции фотоокисления, накапливающимся до определенного момента, а затем переходящим в продукты.

Следует отметить, что такой характер флуоресценции (монотонное накопление продуктов и образование интермедиатов реакции) наблюдается как для ЛГ, так и МЛГ, как для облучения «белым», так и «синим» светом. На рис. 5. Показаны спектры для МЛГ при облучении «синим» светом.



Рис. 5. Спектры флуоресценции МЛГ при возбуждении на 355 нм и 450 нм. И облучении «синим» светом

Отсутствие заметной разницы между облучением «белым» и «синим» светом является дополнительным свидетельством того, что основное фототоксическое воздействие обусловлено синими спектральными компонентами света.

ТоF-SIMS анализ ЛГ и МЛГ.

При анализе масс-спектров контрольных ЛГ были обнаружены пики, соответствующие A2E, что свидетельствует о нарушении целостности ЛГ. Эксперимент был повторен для другого выделения с тем же результатом. Данный фактор не является критичным для установления изменений, вызванных фотоокислением, но делает бессмысленным исследование локализации продуктов фотоокисления.

Для анализа отличий в масс-спектрах гранул был разработан протокол обработки данных на основе метода главных компонент (PCA), активно применяемого в ToF-SIMS [7]. РСА –анализ был проведен для сравнения химически окисленных (надпероксидом калия) и контрольных гранул. Анализ выявил значительные отличие в составе (образование новых пиков). Однако при тщательном анализе точных масс данных пиков оказалось, что они соответствую калию его солям. Вероятно, несмотря И на многостадийную отмывку, незначительные количества калия остались от надпероксида и были детектированы ввиду высокой чувствительности метода к ионам щелочных металлов и их соединений.

При сравнении состава контрольных гранул и облученных светодиодом была выявлена высокая степень вариации данных внутри одного образца. Коэффициент вариации для некоторых пиков достигал значений в 100-200%, что значительно превышает разность в сигнале между образцами. Вероятно, данная вариация обусловлена неоднородностью биологического материала полученного от нескольких пациентов. Пики с вариацией превышающей различие в сигнале между образцами были исключены из сравнения. Для оставшихся пиков была проведена нормировка на сигнал контрольных (необлученных) гранул.

На рис. 6 показано относительное изменение интенсивности некоторых ионов в ЛГ, в зависимости от длительности облучения светодиодом. Наблюдается три характерных схемы поведения сигнала ионов: монотонное возрастание, монотонное убывание и возрастание, затем убывание. Монотонное убывание (например, m/z 41 на рис. 6) соответствует разрушению соединения под действием света. В частности было обнаружено

монотонное уменьшение сигнала витамина Е, присутствующего в тканях глаза в качестве антиоксиданта, как в МЛГ, так и ЛГ.





Рис. 6. Относительная интенсивность некоторых ионов в зависимости от длительности облучения. Данные нормированы на интенсивность необлученного (контрольного) образца.

Другой вариант – монотонное возрастание сигнала (примеры m/z 43, 69, 60, 115) вероятно соответствует продуктам фотоокисления или их фрагментам. Пожалуй, самый интересный вариант – возрастание, затем убывание (m/z 446 и 643). Скорее всего, данные ионы следует отнести к интермедиатам реакции фотоокисления. Следует особо отметить, что возрастание и убывание интенсивностей данных пиков коррелирует с возрастанием и убыванием флуоресценции на рис. 4.

Для МЛГ характерны такие же типы поведения ионов (но пики другие). К продуктам фотоокисления были отнесены пики с m/z 60, 77, 83, 115, 136, 179, 239, 478, 598, а к интермедиатам реакции пики m/z 61, 311, 325, 339. Последние три пика соответствуют одному веществу, поскольку масса отличается на 14 Да, что соответствует CH_2 -группе.

Фемтосекундная антистоксовая рамановская спектроскопия ЛГ и МЛГ.

Как отмечалось выше, образцы ЛГ и МЛГ получены от нескольких пациентов, что проявлялось в высоком уровне вариации сигналов ToF-SIMS. Поэтому была поставлена подзадача получения усредненного характерного колебательного спектра гранул, а также детектирование изменений в усредненном колебательном спектре ЛГ и МЛГ при облучении. При усреднении спектров использовались тысячи спектров отдельных гранул. При изучении в рамках CARS было целесообразно сосредоточиться в рамках так называемого fingerprint диапазона (800-1800 1/см) где видны полосы большинства классов химических соединений, в частности тех, которые являются характерными для ЛГ и МЛГ. Усредненные CARS спектры, приведенные к рамановским колебательным полосам до и после облучения ЛГ приведены на рис 7. Обе кривые (до и после) облучения содержат богатый массив колебательных полос, которые характеризуют усредненный химический состав экстракта. Наиболее характерные и известные в литературе полосы отмечены вертикальными маркерами.



Рис 7: Усредненный CARS спектр (приведенный к рамановскому спектру) для экстракта липофусциновых гранул до облучения УФ (синяя кривая) и после облучения (красная кривая). Цифрами отмечены позиции колебательных полос (расшифровка дана в тексте)

Данные маркеры можно отнести к следующим колебаниям. Маркер 1 (~880 1/см): валентные колебания холиновой группы N⁺(CH₃)₃ которые свойственны липидам, которых: фосфатидилхолин, среди фосфатилэтаноламин, сфингомиелин [8]. Маркеры 2,3 (~910, 993 1/см): С-Н колебания виниловой группы. Спектральные данные обнаруживают выраженные полосы на 1086 (маркер 4) и 1120 (маркер 5) 1/см, что представляет валентные колебания С-С липидов [9]. Далее идут (маркер 6, ~1300 1/см; маркер 7, ~1440 +- 20 1/см) выраженные колебательные полосы крутильных и ножничных колебаний СН₂, соответственно.

Затем идет серия специфичных колебательных полос. Полоса 8 (~1526 1/см) представляет собой С=С колебания каротиноидов. На фоне неспецифичных колебаний (1100, 1300, 1440 1/см) она обычно имеет существенно более низкую интенсивность (в частности даже слабо видна в неочищенном масле), что косвенно отражает относительно невысокое их содержание в исследуемых объектах. Полосы вокруг 1600 1/см в целом

свойственны соединениям так или иначе включающих в себя ароматические группы, что свидетельствует о наличии флюорофоров (напр. A2E). Полоса 1570 1/см (маркер 9) помимо этого также может соответствовать ароматической альфа-аминокислоте фенилаланину. Полоса ~1600 1/см (маркер 10) представляет из себя валентные колебания C=C ароматических колец. Маркеры 11 и 14 (~1650 и ~1740 1/см) являются одними из самых характерных полос липидов, представляющими из себя валентные колебания C=C и эфирной группы, соответственно.

Два оставшихся маркера 12, 13 (~1685, ~1720 1/см) представляли наибольший интерес в контексте рассмотрения вопроса фотоокисления ЛГ при облучении. При фотоокислении липидов отношение интенсивности полос колебаний С=С и эфирной группы (маркеры 11 и 14) практически не изменяются и они могут служит в качестве реперов для эволюции других колебательных полос [10]. Так, например, на рис. 7 видно, что отношение полос маркеров 11 и 14 для необлученного и облученного экстракта составляло ~0.32/0.08 и ~0.60/0.14, соотвественно, т.е. изменение отношения фактически не происходит при облучении. С другой стороны, известно, что полосы 1686 и 1720 1/см (маркеры 12 и 13) характеризуют С=О колебания альдегидов [10], а увеличение отношения маркеров 12 и 13 к реперному маркеру (11 или 14) свидетельствует о процессах окисления в системе. Так, на рис. 7 явно видно, что после облучения отношение интенсивностей маркеров 12 и 13 к маркеру 11 (или 14) существенно возрастает. Для маркера 12 (полоса 1686 1/см) рост составил от 0.16/0.32 до 0.43/0.6, т.е. более 40%. Для маркера 13 (полоса 1720 1/см) рост составил от 0.04/0.32 до 0.1/0.6, т.е. более 30%. Таким образом, можно заключить, что ЛГ под действием света проявляют достаточно сильную степень фотоокисления.

Публикации по теме проекта.

В Журнал аналитической химии направлена статья: А.А. Гулин, В.А. Надточенко, В.Н. Погорелова, М.Я. Мельников, А.Г. Погорелов «Пробоподготовка биологических образцов для анализа их состава и структуры методом времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (ToF-SIMS)»

В сборнике докладов Труды 61-й Всероссийской научной конференции МФТИ. 19–25 ноября 2018 года. Электроника, фотоника и молекулярная физика. — М.: МФТИ, 2018. – 247 с. (ISBN 978-5-7417-0688-6) опубликованы

тезисы А.А. Васин, А.А. Гулин, А.М. Шахов, А.В. Айбуш, А.Е. Солодина, Н.Л. Сакина, А.Е. Донцов, М.А. Островский «Выявление изменений химического состава меланолипофусциновых и липофусциновых гранул в результате окислительных процессов методом ToF-SIMS при помощи PCA-анализа»

Задачи Проекта, которые должны быть решены в следующем году, их связь с целью и задачами Проекта (перечислить задачи и указать распределение исполнителей по задачам на следующий год реализации Проекта)

В 2019 году будут решаться следующие задачи:

- 1 Разработка протоколов пробоподготовки клеточных культур для анализа методами ToF-SIMS и CARS. Подбор оптимального фотосенсибилизатора.
- 2 Разработка методов анализа спектров с целью выявления образования продуктов фотоокисления липидов.
- 3 Исследование продуктов и интермедиатов реакции фотоокисления и их локализации в клеточных мембранах, методами ToF-SIMS и CARS. Выявление изменений в составе мембран клеток, вызванных облучением. Установление влияния параметров облучения на протекание процессов фотоокисления в клеточных мембранах.

Распределение исполнителей по задачам:

Пробоподготовка препаратов – Гулин А.А.

Флуоресцентная спектроскопия – Астафьев А.А.

Разработка протоколов анализа данных, эксперименты ToF-SIMS – Гулин А.А., Васин А.А.

Эксперименты CARS – Айбуш А.В.

Ожидаемые в конце периода, на который будет предоставлен грант, научные результаты

Следующий год посвящен исследование процессов фотоокисления в мембранах клеток, главным образом окислению липидов. Критически важным фактором будет являться пробоподготовка клеток, в частности сохранение состава и структуры клеточных мембран. Будет разработана соответствующая методика пробоподготовки. Будут получены данные об образовавшихся продуктах и, возможно, интермедиатах реакции фотоокисления в клеточных мембранах.

Будет установлено влияние параметров облучения (интенсивность, длина волны, длительность) на образование продуктов и интермедиатов реакции фотоокисления

- Shamsi F.A., Boulton M. Inhibition of RPE Lysosomal and Antioxidant Activity by the Age Pigment Lipofuscin // Investigative Ophthalmology & Visual Science.- 2001.- V. 42.- N. 12.- P. 3041-3046.
- 2. Feeneyburns L., Hilderbrand E.S., Eldridge S. AGING HUMAN RPE MORPHOMETRIC ANALYSIS OF MACULAR, EQUATORIAL, AND PERIPHERAL CELLS // Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1984. V. 25. N. 2. P. 195-200.
- 3. Wassell J., Davies S., Bardsley W., Boulton M. The Photoreactivity of the Retinal Age Pigment Lipofuscin // Journal of Biological Chemistry.- 1999.- V. 274.- N. 34.- P. 23828-23832.
- 4. Rozanowska M., Wessels J., Boulton M., Burke J.M., Rodgers M.A., Truscott T.G., Sarna T. Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media // Free Radic Biol Med.- 1998.- V. 24.- N. 7-8.- P. 1107-12.
- 5. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death // Biochemical and Biophysical Research Communications.- 2017.- V. 482.- N. 3.- P. 419-425.
- 6. Cantrell A., McGarvey D.J., Roberts J., Sarna T., Truscott T.G. Photochemical studies of A2-E // Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology.- 2001.- V. 64.- N. 2-3.- P. 162-165.
- 7. Trindade G.F., Abel M.-L., Watts J.F. simsMVA: A tool for multivariate analysis of ToF-SIMS datasets // Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.- 2018.- V. 182.- P. 180-187.
- Krafft C., Neudert L., Simat T., Salzer R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids // Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy.- 2005.- V. 61.- N. 7.- P. 1529-1535.
- 9. Czamara K., Majzner K., Pacia M.Z., Kochan K., Kaczor A., Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review // Journal of Raman Spectroscopy.- 2015.- V. 46.- N. 1.- P. 4-20.
- Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A., Ayora-Canada M.J. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy // Chemistry and Physics of Lipids.- 2005.-V. 134.- N. 2.- P. 173-182.