

## ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В СУБСТРАТАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ С ПОМОЩЬЮ ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

© 2015 г. И.М. Пискарев\*, С.В. Трофимова\*\* \*\*\*,  
О.Е. Бурхина\*\*\*, И.П. Иванова\*\* \*\*\*

\*НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцына Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова, 119234, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, 1/2;

\*\*Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ,  
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

\*\*\*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

Поступила в редакцию 19.01.15 г.

После доработки 09.02.15 г.

Исследована возможность применения индуцированной хемилюминесценции для оценки способности субстрата к перекисному окислению под действием гидроксильных радикалов и уровня свободнорадикальных процессов, которые произошли в биологических объектах, на основе анализа органических гидроперекисей в пробе. Для этого светосумма хемилюминесценции измерялась в три этапа: при введении  $Fe^{2+}$  в исследуемую пробу, при проведении реакции Фентона (введение  $Fe^{2+}$  и  $H_2O_2$ ) и при введении  $Fe^{2+}$  в пробу после проведения реакции Фентона. Измерена зависимость светосуммы от концентрации (разведения) пробы. Показано, что светосумма достигает максимальной величины при определенном разведении исследуемого субстрата. Положение максимума определяется концентрацией окисляющихся фрагментов  $RH$ , а величина светосуммы хемилюминесценции в максимуме – долей ингибитора  $[InH]/[RH]$  и долей оказавшихся в пробе органических гидроперекисей  $[ROOH]/[RH]$ .

*Ключевые слова:* свободнорадикальные процессы, органическая гидроперекись, индуцированная хемилюминесценция, реакция Фентона, антиоксидант.

Реакции с участием свободных радикалов являются одной из важнейших составляющих процессов, протекающих в живых организмах. Скорость таких реакций поддерживается на определенном уровне. Повышение скорости свободнорадикальных реакций может служить причиной интенсификации окислительных процессов в клетке. Поэтому предполагается, что должен существовать баланс между прооксидантами, поддерживающими цепное окисление, и антиоксидантами, препятствующими развитию цепной реакции. Разработано и применяется много способов оценки баланса прооксидантов и антиоксидантов [1]. Эти способы основаны на иницировании окислительных реакций в пробе или препарате радикалами какого-либо вида и регистрации продуктов, которые могли образоваться в реакции, или наблюдении физико-химических эффектов, сопровождающих цепную реакцию. Количественные оценки делаются на основании сравнения с калибровочной зависимостью, полученной для вещества, принятого в данных условиях за эталон. По

мнению авторов обзора [1], общего подхода для оценки прооксидантной и антиоксидантной способности не существует. Вопрос о применении того или иного метода решается для каждой задачи конкретно.

Одним из методов исследования является индуцированная хемилюминесценция, возникающая в реакциях гидроперекисей с двухвалентным железом. Применение активированной хемилюминесценции для изучения свободнорадикальных процессов было рассмотрено в общем виде в работе [2] и более детально в работах [3,4]. Основные закономерности процесса рассматривались аналитически, что неизбежно требует введение упрощающих предположений, ограничивающих применимость результатов. Метод, изложенный в работе [4], основан на измерении периода индукции, запаздывании появления излучения после введения в пробу, содержащую гидроперекиси, двухвалентного железа. Период индукции увеличивается при увеличении антиоксидантной спо-

способности пробы. Получив калибровочную кривую, связывающую период индукции с концентрацией известного антиоксиданта (например, Тролокса), вводимого в пробу, можно на основании калибровки определить антиоксидантную способность испытываемого образца, эквивалентную определенной концентрации эталонного антиоксиданта в этом образце. В работах [2–4] сразу после введения железа наблюдали излучение, но анализ характеристик этого излучения не проводился.

Регистрация излучения, возникающего в реакции Фентона сразу после введения всех реактивов, применяется в практике биомедицинских исследований [5,6]. Метод позволяет оценивать защитные силы, антиоксидантную способность организма и ее изменения в процессе применения физиотерапевтических процедур на основе взятой пробы (образца крови пациента). Основным преимуществом метода является возможность оперативного контроля состояния изучаемого объекта в процессе применения каких-либо физико-химических воздействий, так как время измерения одной пробы составляет 30 с. Для регистрации излучения созданы приборы БХЛ-6 и БХЛ-7 (Нижний Новгород). Механизм образования свечения, концентрация реагентов и процедура проведения измерений были рассмотрены в работах [7–9]. Было показано, что регистрация хемилюминесценции исследуемой пробы при проведении в ней реакции Фентона позволяет определить способность субстрата к окислению с образованием светящихся продуктов. Недостатком такого метода является неполнота получаемой информации, так как образование светящихся продуктов является только одним из каналов цепного, свободнорадикального окисления.

Следствием протекания в объекте свободнорадикальных процессов могут быть накопленные гидроперекиси, если они не расходуются в дальнейших превращениях, происходящих в объекте (организме). Концентрация гидроперекисей позволяет оценить интенсивность процессов, которые произошли в объекте и в результате которых эти перекиси могли образоваться. Если гидроперекисей нет, это является дополнительной информацией об изучаемом процессе. Представляет интерес изучить возможность использования индуцированной двухвалентным железом хемилюминесценции и реакции Фентона для определения суммарной прооксидантной и антиоксидантной способности биологической пробы или биопрепарата. Полезную информацию можно получить из оценки интенсивности свободнорадикальных процессов в объекте, из которого взята проба,

на основе обнаружения накопленных в объекте к моменту отбора пробы органических гидроперекисей и способности субстрата к окислению. Этому вопросу посвящена настоящая работа.

Цель работы: исследование кинетики хемилюминесценции, индуцированной введением двухвалентного железа и реакцией Фентона, в биопрепаратах, содержащих ингибитор и органические гидроперекиси. Экспериментально измерена хемилюминесценция в органических препаратах и выполнен расчет кинетики процесса путем точного численного решения системы дифференциальных уравнений, описывающих накопление и расходование активных частиц. Численный расчет не требует для анализа процесса применения каких-либо упрощающих предположений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хемилюминесценция в реакции Фентона обусловлена свечением димера синглетного кислорода, образующегося в процессе реакций, инициируемых гидроксильными радикалами [7]. Кроме синглетного кислорода в реакции Фентона образуются гидроперекиси, которые не дают свечения и не могут быть непосредственно зарегистрированы. Органические гидроперекиси также могут быть и в исходной пробе. В настоящей работе органические гидроперекиси определяли по хемилюминесценции, возникающей после введения двухвалентного железа.

Хемилюминесценцию регистрировали био-хемилюминометром БХЛ-7 (Нижний Новгород, Россия) по следующей схеме.

Перед определением концентрации органических гидроперекисей, имеющихся в исследуемом образце, оценивали фоновое свечение пробы  $S_b$  до введения двухвалентного железа. Свечение  $S_b$  возникает под действием радиационного фона в помещении [10]. Оно может меняться в широких пределах (в несколько раз).

1) К исследуемому субстрату добавляли раствор двухвалентного железа (оценивали хемилюминесценцию в реакции железа с уже имеющимися в субстрате органическими гидроперекисями, получали светосумму  $S_1$ ).

2) К исследуемому субстрату добавляли раствор двухвалентного железа и перекись водорода (оценивали хемилюминесценцию под действием гидроксильных радикалов, генерируемых в реакции Фентона – выход светящихся продуктов, светосумма  $S_2$ ).

3) Через 90 с после начала реакции Фентона к пробе 2 добавляли раствор двухвалентного

железа (оценивали хемилюминесценцию в реакции железа с начально имевшимися в субстрате и накопленными после проведения реакции Фентона гидроперекисями, получали светосумму  $S_3$ ). Двухвалентное железо, введенное ранее в пробу 2, к этому времени полностью израсходовалось [7]. Как будет показано далее, на всех трех этапах механизм образования свечения остается одним и тем же: светится димер синглетного кислорода, поэтому светосуммы  $S_b$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$  можно непосредственно сравнивать.

Во всех случаях сразу после введения всех реагентов кювету переводили в рабочее положение: устанавливали напротив катода фотоэлектронного умножителя и затемняли, после чего автоматически начиналась регистрация излучения. Время регистрации 30 с. Объем кюветы 2 мл, диаметр 1 см. Использовали реактивы: раствор  $FeSO_4$  ( $10^{-3}$  моль/л) в кислой среде, рН 2; раствор перекиси водорода ( $10^{-3}$  моль/л). Кислую среду для растворов железа получали путем добавления серной кислоты в дистиллированную воду в связи с тем, что в нейтральной среде двухвалентное железо нестабильно. Выбор концентрации реагентов и условий измерений был обсужден в работе [7].

Объем проб:

1) Фоновая проба  $S_b$  – без исследуемого субстрата: 0,7 мл растворителя (вода или раствор Хенкса).

2) Проба 1: 0,1 мл исследуемого субстрата, 0,6 мл растворителя (вода или раствор Хенкса) и непосредственно перед измерением 0,4 мл раствора  $Fe^{2+}$  – регистрация излучения  $S_1$ .

3) Проба 2: 0,1 мл исследуемого субстрата, 0,4 мл растворителя, 0,4 мл раствора  $Fe^{2+}$ . Последним реагентом вводили 0,2 мл перекиси водорода – регистрация излучения  $S_2$ . Для определения фона измеряли хемилюминесценцию холостой пробы  $S_0$  – без исследуемого субстрата, только реакция Фентона: 0,5 мл растворителя, 0,4 мл раствора  $Fe^{2+}$  и 0,2 мл перекиси водорода.

4) Проба 3: через 90 с после введения перекиси водорода в ту же кювету (проба 2) снова вводили 0,4 мл раствора  $Fe^{2+}$ , после чего регистрировали излучение  $S_3$ . Фоновая проба  $S_b$  та же, что в пункте 1.

В работе исследовали индуцированную реакцией Фентона хемилюминесценцию альбумина, гемоглобина, смеси альбумина с гемоглобином, а также глюкозы, щавелевой кислоты, фенола и крови. Изучали также хемилюминесценцию смеси фенола с гемоглобином и альбумином. Концентрации альбумина 50 г/л, гемоглобина 70 г/л и глюкозы 5 г/л выбраны

близкими концентрации в крови. Концентрация щавелевой кислоты 50 г/л, фенола 50 г/л. Фенол (антиоксидант) вводили непосредственно в пробу альбумина и гемоглобина перед добавлением перекиси водорода в количестве 0,1 мл.

Использовали бычий альбумин сывороточный, фракция V ( $M = 69$  кДа) и гемоглобин свиной крови ( $M = 66,8$  кДа) фирмы BioWest. В обоих препаратах массовая доля белка не менее 95%, массовая доля жира (липидов) не более 1%. Использовали химически чистые вещества: глюкозу, щавелевую кислоту, фенол и дважды дистиллированную воду рН 6,5. В качестве биологического субстрата использовали гепаринизированную цельную кровь здорового самца крысы линии Вистар. Кровь гемолизовали замораживанием при температуре  $-20^\circ C$ .

В работах [7,8] было предложено изучать зависимость светосуммы от концентрации (разведении) пробы. Экспериментально было установлено, что в исходной пробе с концентрацией, характерной для биологических объектов, при разведении образца светосумма сначала увеличивается, достигает максимума, потом уменьшается. Появление пика свечения при определенном разведении исходного вещества как для реакции Фентона, так и для реакции, возникающей после введения двухвалентного железа, обусловлено особенностями кинетики процесса. Наличие максимума светосуммы при определенном разведении связано с конкуренцией разных каналов реакций продолжения цепи.

Поэтому в данной работе измерения начинали с регистрации светосуммы пробы в исходной концентрации, далее пробу последовательно десятикратно разбавляли водой, получали светосуммы при концентрациях  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ...  $10^{-10}$  от исходной. Предварительные эксперименты показали, что полуширина максимума свечения в зависимости от разведения составляет  $\pm$  одно разведение, т.е. если максимум свечения достигается при разведении  $10^{-2}$ , то светосумма уменьшается примерно в два раза при разведениях  $10^{-3}$  и  $10^{-1}$ . Поэтому выбор шага разведения 1/10 представляется обоснованным. Хемилюминесценцию после введения двухвалентного железа измеряли также при последовательных разведениях пробы. Следует подчеркнуть, что при слишком большой концентрации углеводов РН в пробе свечение не возникает как в реакции Фентона, так и при введении только двухвалентного железа [8]. Оно появится только после разведения пробы.

Для уменьшения влияния нестабильности аппаратуры на результаты, в реакции Фентона рассматривали отношение  $S/S_0$ , где  $S$  – светосумма пробы,  $S_0$  – светосумма холостой пробы

без исследуемого вещества. Если отношение  $S/S_0 > 1$ , это означает, что в пробе под действием гидроксильных радикалов развивается цепная реакция, вещество пробы является прооксидантом. Отношение  $S/S_0$  растет с ростом прооксидантной активности. Для антиоксиданта (вещества, которое не поддерживает цепную реакцию)  $S/S_0$  меньше или равно единице [8].

Расчеты и измерения, выполненные ранее [7,8], показали, что зависимость светосуммы  $S/S_0$  в реакции Фентона от разведения (концентрации) исследуемого окисляющегося вещества достигает максимума в интервале разведений от 0 ( $10^\circ$ , исходное вещество) до  $-4$  ( $10^{-4}$ ). При дальнейших разведениях ( $-5 \div -10$ ) светосумма уменьшается до значений  $S/S_0 \sim 1$  и остается на этом уровне. Свечение, возникающее при введении только двухвалентного железа и связанное с наличием органических гидроперекисей, достигает максимума для данной пробы при том же разведении, что и в реакции Фентона, и при дальнейшем разведении уменьшается до уровня радиационного фона  $S_b$ . Поэтому для повышения статистической точности можно рассматривать как среднюю, так и общую светосумму для разведений от 0 до  $-4$ .

#### РАСЧЕТ КИНЕТИКИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Расчет кинетики изучаемых процессов осуществляли следующим образом [7]. Составляли схему реакций, которая описывает процесс. В схему включали все вещества, участвующие в реакции. Так как константы скоростей всех реакций известны, то можно было рассчитать кинетику процесса. Для этого на основе схемы реакций составляли систему дифференциальных уравнений, где переменными являлись концентрации участвующих в процессе веществ. В каждое уравнение входят скорости накопления и расходования вещества, концентрация которого рассматривается как переменная. Число уравнений равно числу веществ, участвующих в реакции. Задаются начальные условия, т.е. концентрации всех веществ в начальный момент времени. Решением являются концентрации всех участвующих в реакции веществ через заданные интервалы времени после начала реакции. Длительность этих интервалов и полное время реакции задаются как условия. Для расчета кинетики хемилюминесценции, оценки влияния на светосумму в реакции Фентона ингибитора и гидроперекисей, накопленных в пробе до испытаний, решали систему из 14 дифференциальных уравнений [7]. Кинетику образования свечения сразу при введении в пробу только

двухвалентного железа рассчитывали путем решения системы из восьми дифференциальных уравнений. Для решения систем дифференциальных уравнений использовали пакет программ MathCad 14.

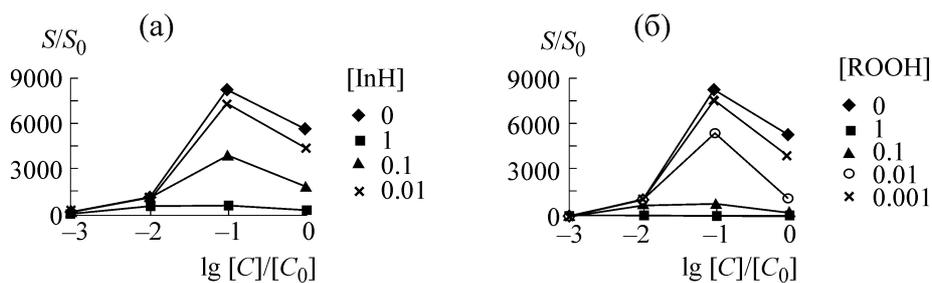
#### ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ, ИНИЦИИРОВАННОГО В РЕАКЦИЯХ ДВУХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА С ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА И ГИДРОПЕРЕКИСЬЮ

В реакции двухвалентного железа с перекисью водорода образуются гидроксильные радикалы (реакция Фентона). Классическая схема перекисного окисления углеводородов RH гидроксильными радикалами описывается следующим образом:



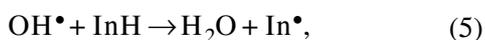
Здесь  ${}^1O_2$  – синглетный кислород. M – третья частица, которая в реакции непосредственно не участвует, но она нужна для того, чтобы обеспечить выполнение законов сохранения энергии и импульса. Без третьей частицы M реакция (2) невозможна, развитие цепной реакции также невозможно без кислорода. Продуктами реакций (1)–(4) являются гидроперекиси ROOH, стабильные соединения ROOR и синглетный кислород. Выход ROOR и синглетного кислорода одинаков, так как эти продукты образуются в одной реакции. Синглетный кислород регистрируется, поэтому будем далее говорить только об образовании в реакции (4) синглетного кислорода. Полный выход свободнорадикального окисления равен сумме выходов гидроперекисей и синглетного кислорода. Синглетный кислород образует димер, свечение которого в красной области спектра регистрируется биохемилуминометром [7].

Рассмотрим действие антиоксиданта-ингибитора. Ингибирование цепного окисления заключается в том, что применяется реагент, обозначим его InH, который с высокой скоростью взаимодействует с радикалами, например с  $OH^\bullet$  и  $ROO^\bullet$ . Взаимодействуя с первичным радикалом (инициатором  $OH^\bullet$ ) или вторичным радикалом  $ROO^\bullet$ , образующимся в процессе цепной



**Рис. 1.** Зависимости светосуммы ( $S/S_0$ ) в реакции Фентона от разведения пробы ( $\lg [C]/[C_0]$ ), где  $[C]$  – концентрация разбавленной пробы,  $[C_0]$  – начальная концентрация пробы) при концентрации окисляющегося вещества  $[RH] = 1$  моль/л для концентраций ингибитора  $[InH] = 0; 0,01; 0,1$  и  $1$  моль/л (а) и концентраций гидроперекиси  $[ROOH] = 0; 0,001; 0,01; 0,1$  и  $1$  моль/л (б).

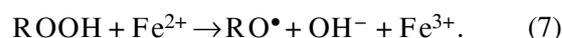
реакции, ингибитор  $InH$  дает малоактивный вторичный радикал  $In^\bullet$ .



В реакции (5) ингибитор перехватывает первичный радикал  $OH^\bullet$ , предотвращая начало цепной реакции, а в реакции (6) ингибитор перехватывает вторичный радикал  $ROO^\bullet$ , образовавшийся после инициирования реакции гидроксильным радикалом и предотвращает продолжение цепи. Если ингибитор  $InH$  перехватывает первичный радикал, предотвращая инициирование цепной реакции, то можно говорить, что он обладает антирадикальной активностью. Если ингибитор перехватывает вторичный радикал и препятствует развитию цепной реакции, то можно говорить, что он обладает антиоксидантной активностью. Ингибитор может не полностью прекращать цепную реакцию, а только ее замедлять. Причиной может быть как малая активность ингибитора (малая константа скорости реакции), так и его малая концентрация.

Для оценки свойств препарата его вводят в пробу, представляющую интерес для конкретной задачи. Если испытываемое вещество (препарат), вводимое в пробу, замедляет иницируемую внешним воздействием цепную реакцию, логично говорить, что данное вещество действует как антиоксидант (ингибитор). Если вводимое вещество ускоряет цепную реакцию, то данное вещество действует как прооксидант. Относительную антиоксидантную способность препарата можно оценивать путем сравнения с действием другого препарата, активность которого принята за эталон.

При наличии в образце органической гидроперекиси она взаимодействует с двухвалентным железом.



Радикалы  $RO^\bullet$  при наличии в пробе органического вещества  $RH$  иницируют цепную реакцию перекисного окисления этого вещества:



При взаимодействии между собой радикалы  $RO^\bullet$  гибнут и свечения не дают:



#### РАСЧЕТ КИНЕТИКИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РЕАКЦИИ ФЕНТОНА

Расчет кинетики образования свечения в реакции Фентона в присутствии ингибитора  $InH$  и гидроперекиси  $ROOH$  осуществляли на основе схемы из 21 реакции, в которую кроме 20 реакций, рассмотренных в работе [7], включали реакцию (5). Решали систему 14 дифференциальных уравнений. Свечение, сопровождающее реакцию Фентона, обусловлено распадом димера синглетного кислорода. Синглетный кислород образуется в реакции (4) [7].

Расчетные зависимости светосуммы  $S/S_0$ , регистрируемой в реакции Фентона, при разных концентрациях ингибитора  $InH$  и гидроперекиси  $ROOH$  представлены на рис. 1. В расчете предполагалось, что константа скорости реакции (1) вещества  $RH$  с гидроксильными радикалами составляет  $10^7$  л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>, а реакции (5) с ингибитором  $10^9$  л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>. Значения остальных констант характерны для биологической пробы [8].

Из рис. 1 видно, что положение максимума хемилюминесценции не зависит от концентрации  $InH$  и  $ROOH$ . Как показали расчеты, положение максимума определяется концентраци-

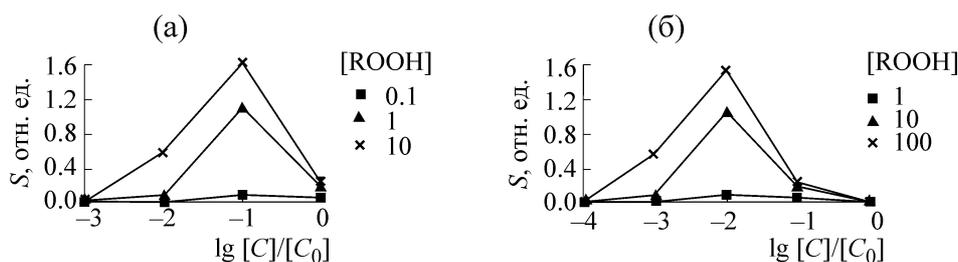


Рис. 2. Зависимости светосуммы  $S$  (отн. ед.) от отношения концентраций  $\lg [C]/[C_0]$  (разбавления пробы): (а) –  $[RH] = 1$  моль/л,  $[ROOH] = 0,1; 1$  и  $10$  моль/л; (б) –  $[RH] = 10$  моль/л,  $[ROOH] = 1, 10$  и  $100$  моль/л.

ей  $RH$ . Но величина светосуммы определяется отношением концентраций  $[InH]/[RH]$ ,  $[ROOH]/[RH]$  и не зависит от величины  $[RH]$ . Светосумма  $S/S_0$  в реакции Фентона уменьшается с ростом концентрации как ингибитора, так и гидроперекиси.

#### РАСЧЕТ КИНЕТИКИ РЕАКЦИИ ДВУХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА С ГИДРОПЕРЕКИСЬЮ

При введении в пробу, содержащую гидроперекись, двухвалентного железа происходят реакции (7) и (8), в которых образуются радикалы, дающие начало цепной реакции. Продолжение цепи – реакции (2)–(4). Свечение возникает после образования синглетного кислорода в реакции (4). Если в пробе нет фрагментов органического вещества  $RH$ , а только гидроперекиси  $ROOH$ , то свечение при введении двухвалентного железа не возникнет, так как не будет продолжения цепи (реакции (2)–(4)). В случае больших молекул, например белков, под  $RH$  подразумеваются фрагменты углеводородов, которые могут участвовать в цепной реакции. Их концентрация намного больше, чем концентрация самого белка. Если концентрация вещества  $RH$  слишком велика, то реакция (3) будет преобладать, она блокирует свечение, и оно не возникнет. При разбавлении пробы роль реакции (3) уменьшается, становится заметным выход реакции (4) и свечение появляется. Таким образом, в процессе определения уровня органических гидроперекисей также необходимо измерять светосумму при разных разведениях, как в реакции Фентона. Измерение хемилюминесценции только при одной концентрации пробы приведет к получению принципиально ошибочного результата, если положение максимума светосуммы для двух сравниваемых проб окажется при разных разведениях.

Расчет кинетики образования свечения при добавлении в пробу двухвалентного железа осуществляли с учетом реакций (2)–(4) и (7)–(9).

Решали систему из восьми дифференциальных уравнений. Рассчитывали хемилюминесценцию условного органического вещества  $RH$  при значениях констант, характерных для многих углеводородов [7]. Рассмотрены два случая: 1)  $[RH] = 10$  моль/л при концентрациях гидроперекисей  $[ROOH] = 1; 10$  и  $100$  моль/л; и 2)  $[RH] = 1$  моль/л при  $[ROOH] = 0,1; 1$  и  $10$  моль/л. Зависимости светосуммы  $S$  от разведения представлены на рис. 2. Из расчетов следует, что величина светосуммы определяется отношением концентраций  $[ROOH]/[RH]$ . Абсолютная величина концентрации  $RH$  определяет разведение, при котором наблюдается максимум светосуммы. В рассмотренных на рис. 2 случаях одинаковое значение светосуммы в максимуме, равное  $S = 1,6$  отн. ед., наблюдается как при концентрации  $[RH] = 1$ , так и  $[RH] = 10$  моль/л, если отношение  $[ROOH]/[RH]$  одинаково и равно 10. Положение максимума определяется величиной концентрации  $RH$  и не меняется при изменении концентрации гидроперекисей  $ROOH$ . В случае, приведенном на рис. 2, максимум светосуммы при  $[RH] = 10$  моль/л достигается для разведения  $-2$ , а при  $[RH] = 1$  моль/л – для разведения  $-1$ .

Светосумма хемилюминесценции, регистрируемая при введении двухвалентного железа, растет с ростом концентрации гидроперекиси. Она пропорциональна уровню имеющихся в образце гидроперекисей  $[ROOH]$ . Если при последовательных разведениях максимум светосуммы не наблюдается и с уменьшением концентрации пробы (при разведении) светосумма только уменьшается, это значит, что концентрация углеводородных фрагментов (групп  $RH$ ) в исходной пробе мала, меньше значения, при котором мог бы наблюдаться в данных условиях максимум.

Для сравнения подчеркнем, что при проведении реакции Фентона в исследуемом образце, как показывают расчеты (см. рис. 1), при наличии органической гидроперекиси  $ROOH$  светосумма хемилюминесценции всегда уменьша-

**Таблица 1.** Средняя светосумма  $S/S_0$  при разведениях от 0 (исходная проба) до  $-4$ 

Вещество пробы	Средняя светосумма $S/S_0$
Фенол	$0,78 \pm 0,1$
Гемоглобин	$4,0 \pm 0,5$
Гемоглобин + фенол	$1,0 \pm 0,2$
Альбумин	$12,4 \pm 2,1$
Альбумин + фенол	$1,02 \pm 0,2$
Щавелевая кислота	$1,6 \pm 0,4$
Глюкоза	$1,63 \pm 0,4$

ется с ростом концентрации  $ROOH$ , при этом положение максимума свечения также остается на прежнем месте. Аналогичная картина наблюдается и при введении в исследуемую пробу антиоксиданта  $InH$ : с ростом концентрации  $InH$  светосумма хемилюминесценции при проведении реакции Фентона всегда уменьшается, а положение максимума определяется концентрацией  $RH$ . Если концентрация групп  $RH$  остается постоянной, то положение максимума не меняется.

Если в процессе какого-либо физико-химического воздействия на исследуемый субстрат положение максимума хемилюминесценции смещается вправо (в сторону меньших разведений), как после проведения реакции Фентона, так и после введения в пробу двухвалентного железа, это означает, что концентрация фрагментов  $RH$  в пробе после произведенного физико-химического воздействия уменьшилась. Если положение максимума смещается влево, в сторону больших разведений, это означает, что исходное высокомолекулярное вещество (например, белок или липид) в процессе воздействия разрушается и появляется много фрагментов  $RH$ , которые не проявляли ранее химической активности, когда были в составе белка или другого сложного соединения.

Мы показали, что светосумма хемилюминесценции  $S$  в районе максимума свечения как в реакции Фентона, так и при введении двухвалентного железа не зависит от концентрации  $RH$  (положения максимума свечения) и определяется отношением концентраций ингибитора и накопленных органических гидроперекисей:  $InH/RH$ ,  $ROOH/RH$ . Поэтому для повышения статистической точности при анализе экспериментальных результатов можно учитывать как среднее значение  $S$  при разных разведениях в районе максимума свечения (разведения от 0 до  $-4$ ), так и суммарное значение  $S$  для всех разведений в районе максимума.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ОБСУЖДЕНИЕ: РЕАКЦИЯ ФЕНТОНА

Если во время реакции Фентона инициируется и развивается цепная реакция с образованием светящихся продуктов, то регистрируемая при этом светосумма  $S$  превышает светосумму холостой пробы  $S_0$ ,  $S/S_0 > 1$ . Отношение  $S/S_0$  будет характеризовать способность субстрата к окислению с образованием этих светящихся продуктов. Экспериментальные результаты для ряда исследованных веществ, средние значения отношений  $S/S_0$  при разведениях от 0 до  $-4$ , приведены в табл. 1.

Измерения показали, что для белков наблюдается максимум хемилюминесценции при разведениях:  $-1$  (альбумин) и  $-2$  (гемоглобин). Расчет показал, что максимум при таких разведениях может быть для концентраций  $RH = 1$  и  $10$  М соответственно. Наличие максимумов хемилюминесценции при таких разведениях подтверждает, что в процессе перекисного окисления участвуют много фрагментов белков  $RH$ , так как молярная концентрация самих белков мала, меньше  $10^{-3}$  М. Возможное наличие в препаратах примеси липидов (меньше 1%) также не может объяснить наличие максимумов хемилюминесценции при разведениях  $-1$  и  $-2$ .

Из табл. 1 видно, что для антиоксиданта (фенол) светосумма не превышает светосумму холостой пробы,  $S/S_0 < 1$ . При добавлении антиоксиданта (фенола) в растворы гемоглобина и альбумина хемилюминесценция этих веществ в реакции Фентона прекращается,  $S/S_0 \sim 1$ , хотя в исходных растворах  $S/S_0 > 1$ . Щавелевая кислота, которая не содержит фрагментов  $RH$ , не поддерживает цепное окисление с образованием светящихся продуктов, максимума хемилюминесценции для щавелевой кислоты нет. Хотя наблюдается небольшое превышение светосуммы  $S$  по сравнению с холостой пробой  $S_0$ . Это может быть связано с образованием продуктов, влияющих на хемилюминесценцию самой реакции Фентона. В частности, при окислении гидроксильными радикалами щавелевой кислоты образуется перекись водорода [11], увеличение концентрации которой приводит к увеличению хемилюминесценции.

Для углеводов, к числу которых относится глюкоза, характерно прямое окисление кислородом с выделением энергии. Глюкоза легко окисляется до карбоновой кислоты, гидроперекись не образуется. Поэтому особенностей, характерных для перекисного окисления углеводов (липидов), не наблюдается. Превышение светосуммы  $S$  над фоновым значением  $S_0$  может быть связано с особенностями механизма

**Таблица 2.** Светосумма (мВ, отн. ед.), зарегистрированная при введении в пробу двухвалентного железа ( $S_1$  и  $S_3$ ) и в процессе реакции Фентона ( $S_2$ ).  $S_1$  – хемиллюминесценция пробы после введения  $Fe^{2+}$  (1 этап);  $S_2$  – хемиллюминесценция пробы после введения  $Fe^{2+} + H_2O_2$  (2 этап);  $S_3$  – хемиллюминесценция пробы через 90 с после индукции хемиллюминесценции во 2-м этапе и после введения  $Fe^{2+}$  (3 этап);  $S_b$  – радиационный фон в помещении. Во всех случаях  $S = \Sigma S_i$ , где  $S_i$  – светосуммы при разведениях от 0 до –4

Вещество пробы	Шум $S_b$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$(S_1 + S_2 + S_3) - 2S_b$
Альбумин	450 ± 100	440 ± 100	14780 ± 500	12870 ± 550	27190 ± 1000
Гемоглобин	430 ± 100	460 ± 100	6930 ± 400	7640 ± 400	13670 ± 800
Альбумин + гемоглобин	510 ± 100	700 ± 100	8850 ± 400	9170 ± 420	17720 ± 850
Гемолизат крови	550 ± 100	1360 ± 150	7650 ± 400	8600 ± 390	16310 ± 900

реакции. При больших разведениях (от –5 до –10) среднее значение светосуммы для всех исследованных веществ  $S/S_0 = 1,09 \pm 0,2$  в пределах ошибок измерений близко к единице.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ СУБСТРАТА К ОКИСЛЕНИЮ

Для определения способности субстрата к окислению и уровня свободнорадикальных процессов, которые произошли в объекте до взятия пробы, т.е. наличия в ней органических гидроперекисей, определяли: 1) светосумму хемиллюминесценции ( $S_1$ ) после введения ионов железа; 2) светосумму в реакции Фентона ( $S_2$ ) и 3) светосумму хемиллюминесценции после протекания реакции Фентона и дополнительного введения ионов железа – оценка концентрации исходных и накопленных в процессе проведения реакции Фентона гидроперекисей ( $S_3$ ); 4) светосумму, обусловленную радиационным фоном в помещении  $S_b$ . Выше нами было показано, что механизм свечения во всех случаях одинаковый, регистрируется свечение димера синглетного кислорода, синглетный кислород образуется в реакции (4), поэтому светосуммы  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_b$  можно непосредственно сравнивать. Полная величина светосуммы по всем разведениям от 0 до –4 для альбумина, гемоглобина, их смеси и гемолизированной крови приведены в табл. 2. Фоновая светосумма в реакции Фентона  $S_0$  намного меньше светосуммы  $S_2$ , она в пределах ошибок измерений, поэтому величина  $S_0$  не учитывается. Светосуммы приведены в относительных единицах (милливольтах). Милливольты выбраны в связи с тем, что выходное напряжение сигнала с биохемиллюминметра измеряется в милливольтах. Там же приведены полные светосуммы, полученные для всех трех этапов, из которых вычтен радиационный фон помещения:  $(S_1 + S_2 + S_3) - 2S_b$ . Из табл. 2 видно, что в исходных веществах (альбумин, гемоглобин, их смесь) органических гидропе-

рекисей нет, величина  $S_1$  не превышает  $S_b$ . Гемолизированная кровь самца крысы содержит органические гидроперекиси,  $S_1 > S_b$ . После проведения в альбумине, гемоглобине и их смеси реакции Фентона в них появляются органические гидроперекиси,  $S_3 \gg S_b$ . В гемолизированной крови после реакции Фентона содержание органических гидроперекисей увеличивается,  $S_3 > S_1$ . Отношение светосумм на этапах 2 и 3 ( $S_2/S_3$ ) характеризует отношение вероятностей каналов реакции Фентона, в которых образуется синглетный кислород ( $S_2$ ) и органическая гидроперекись ( $S_3$ ). Как видно из табл. 2, соотношение  $S_2/S_3$  меняется для разных веществ, поэтому характеризовать окислительную способность пробы только выходом светящихся продуктов в реакции Фентона некорректно. Светосумма  $S_3$  характеризует способность субстрата к окислению под действием гидроксильных радикалов с образованием гидроперекисей. Сумма  $S_2 + S_3$  характеризует полную способность субстрата к окислению, как с образованием светящихся продуктов, так и с образованием гидроперекисей.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОБЪЕКТЕ

В живых организмах постоянно идут окислительно-восстановительные реакции, в том числе перекисное окисление липидов и углеводородных фрагментов РН, которые являются частью более сложных молекул, например белков. Способность субстрата к перекисному окислению, рассмотренная выше, характеризует защитную реакцию объекта, которая определяется на основе взятой пробы. Следы протекания в объекте (организме) свободнорадикальных реакций являются гидроперекиси, которые могут накапливаться в этих реакциях. Поэтому можно рассчитывать, что, определяя гидроперекиси и сравнивая их концентрацию для нор-

мально функционирующего организма и в патологическом состоянии, мы сможем различать эти состояния. Как было показано выше, светосуммы  $S_1$  и  $S_3$  определяются концентрацией гидроперекиси в пробе. Рассмотрим, как на основе светосумм, получаемых в реакциях с двухвалентным железом, можно оценить интенсивность свободнорадикальных реакций в объекте, откуда была взята проба.

Светосумма исходной пробы  $S_1$ , характеризует интенсивность свободнорадикальных процессов в организме (объекте), которые произошли до отбора пробы и привели к накоплению гидроперекисей. Сравнение светосумм  $S_1$  и  $S_3$  для конкретного исследуемого образца позволяет определить количество актов свободнорадикальных процессов, которые произошли в объекте. Сущность подхода в следующем. Известно, сколько гидроксильных радикалов  $N_f$  было выработано и израсходовано в реакции Фентона:  $N_f = 10^{-3}$  моль/л (концентрация введенных ионов двухвалентного железа). Эти радикалы расходуются практически полностью в реакции с пробой РН, так как концентрация пробы намного больше концентрации любых промежуточных продуктов реакции Фентона [7]. Это количество гидроксильных радикалов дает увеличение светосуммы:

$$N_f \rightarrow (S_3 - S_1). \quad (10)$$

Светосумма  $S_3 - S_1$  образовалась при действии  $N_f$  гидроксильных радикалов в реакции Фентона на пробу. В объекте происходили реакции, инициированные различными радикалами, но при перекисном окислении результат их действия – гидроперекиси  $ROOH$ . Обозначим  $N_{OH}$  количество (концентрацию) радикалов в пробе, действие которых эквивалентно действию гидроксильных радикалов. Эти радикалы привели к появлению в объекте органических гидроперекисей, которые были взяты на анализ вместе с пробой. Их хемилюминесценция дает светосумму  $S_1 - S_b$ . Светосумма  $S_1 - S_b$  образовалась при действии  $N_{OH}$  радикалов в объекте:

$$N_{OH} \rightarrow S_1 - S_b. \quad (11)$$

Составляя пропорцию, получим:

$$N_{OH} = N_f \frac{S_1 - S_b}{S_3 - S_1}. \quad (12)$$

Проанализируем эту ситуацию для гемолизированной крови, данные приведены в табл. 2.

Подставляя численные значения из табл. 2 в выражение (12), получим:

$$N_{OH} = N \cdot \frac{1360 - 550}{8600 - 1360} = 10^{-3} \frac{810}{7240} = 1,1 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л.} \quad (13)$$

Таким образом, можно утверждать, что в гемолизированной крови до момента анализа произошло количество актов перекисного окисления, приведшего к накоплению гидроперекисей, которое равносильно действию гидроксильных радикалов суммарной концентрацией  $N_{OH} = 1,1 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Видно, что анализ образцов с использованием реакции Фентона и ее модификации (реакция только с двухвалентным железом) позволяет определить активность свободнорадикальных процессов в объекте по содержанию гидроперекисей в образце, взятом из этого объекта. При этом определяется и полная способность субстрата к перекисному окислению, которая равна  $S_2 - S_0 + S_3 - S_b$ . Для оценки величины окислительной способности образца ее можно сравнивать с окислительной способностью эталона, который будет иметь смысл использовать при рассмотрении конкретной задачи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова и Е. В. Мальцева, Химия растительного сырья, № 3, 63 (2004).
2. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
3. Yu. A. Vladimirov, E. V. Proskurina, and D. Yu. Izmailov, Bull. Experim. Biol. Med. **144** (Suppl. 2), 390 (2007).
4. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина и Д. Ю. Измаилов, Биофизика **56** (6), 1081 (2011).
5. О. В. Занозина, Н. Н. Бровкова и Т. Г. Щербатюк, Современ. технологии в медицине, № 3, 104 (2010).
6. А. В. Алясова, К. Н. Конторщикова, И. Г. Терентьев и др., Современ. технологии в медицине, № 4, 27 (2010).
7. I. P. Ivanova, S. V. Trofimova, I. M. Piskarev, et al., J. Biophys. Chem. **3** (1), 88 (2010).
8. И. П. Иванова, С. В. Трофимова и И. М. Пискарев, Современ. технологии в медицине, № 4, 14 (2014).
9. И. П. Иванова, С. В. Трофимова и И. М. Пискарев, Биофизика **58** (4), 582 (2013).
10. С. В. Ермолин, И. П. Иванова, Д. И. Князев., Журн. физ. химии **86** (6), 1140 (2012).
11. Н. А. Аристова, Т. С. Мокина и И. М. Пискарев, Журн. общей химии **72** (5), 756 (2003).

## Investigation of Free Radical Processes in Substrates and Biological Samples by Means of induced Chemiluminescence

I.M. Piskarev\*, S.V. Trofimova\*\* \*\*\*, O.E. Burkina\*\*\*, and I.P Ivanova\*\* \*\*\*

\*Skobel'syn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119234 Russia

\*\*Nizhny Novgorod Medical State Academy, Ministry of Health of the Russian Federation,  
pl. Minina i Pojarskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

\*\*\*Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

The possibility of applying induced chemiluminescence was investigated to evaluate oxidative capability of the substrate under the action of hydroxyl radicals and estimate the intensity of free radical processes in biological samples based on the analysis of the organic hydroperoxyde response in a probe. For this purpose the chemiluminescence light sum was measured in 3 steps: when  $\text{Fe}^{2+}$  was introduced into in a sample; in course of Fenton reaction (introducing  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and when  $\text{Fe}^{2+}$  was introduced into the sample after Fenton reaction. Light sum was measured depending on concentration (dilution) of the sample. It was shown that the light sum reaches the maximum value at certain dilution of the substrate studied. The maximum chemiluminescence's position is determined by concentration of RH fragments being oxidized, but the chemoluminescence light sum value is determined partially by the inhibitor  $[\text{InH}]/[\text{RH}]$  and organic hydroperoxides  $[\text{ROOH}]/[\text{RH}]$  found in the sample.

*Key words: free radical processes; organic hydroperoxides; induced chemiluminescence, Fenton reaction; antioxidant*