

## ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ – ПЕРВИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРОКСИДАЗНОЙ РЕАКЦИИ

© 2017 г. Д.Ю. Измайлов, Е.В. Проскурнина, С.А. Шишканов,  
Г.А. Владимирова, Ю.А. Владимиров

Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
119234, Москва, Ломоносовский просп., 27/1

E-mail: info@fbm.msu.ru

Поступила в редакцию 07.12.16 г.

Антиоксиданты подавляют образование радикалов в пероксидазных процессах. Сравнение кинетических кривых хемилюминесценции в системе пероксидаза хрена/люминол/ $H_2O_2$  с результатом математического моделирования реакций показало, что действие антиоксидантов тролокса, аскорбата и мексидола обусловлено реакцией радикала люминола с молекулой ингибитора (константы скорости  $1,0 \cdot 10^{10}$ ,  $9,0 \cdot 10^9$  и  $2,3 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>мин<sup>-1</sup> соответственно). Антирадикальное действие кверцетина было описано системой из восьми реакций, основанной на предположении о наличии двух реакционных центров в молекуле, каждый из которых реагирует с двумя радикалами. Предположение, что молекула антиоксиданта взаимодействует не с радикалом продукта реакции, а с молекулами фермента в пероксидазном цикле, не подтвердилось: расчетные кривые расходились с экспериментальными. В живых клетках образование радикалов пероксидазами и его последствия (например, апоптоз) может, таким образом, быть заторможено не только путем ингибирования самого фермента, но и антиоксидантами – перехватчиками радикалов продукта реакции.

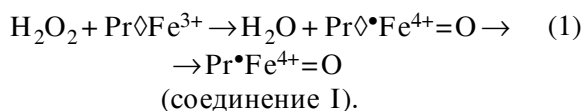
*Ключевые слова:* пероксидазная реакция, хемилюминесценция, математическое моделирование кинетики.

Антиоксиданты – это соединения, препятствующие появлению свободных радикалов в клетках, тканях или пищевых продуктах. Классические низкомолекулярные антиоксиданты, такие как токоферол, убихинон, тироксин, растительные полифенолы, служат ловушками свободных радикалов, прежде всего радикалов, ведущих цепное окисление липидов в биологических мембранах [1]. Исследования В.Е. Кагана с сотрудниками показали, что липидная пероксидация в живых клетках может быть вызвана действием комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, который обладает пероксидазной активностью [2,3]. Затем в нашей лаборатории было показано, что при перекисном окислении полиненасыщенных жирных кислот и природного кардиолипина, катализируемом комплексом цитохрома *c*, образуются липопероксильные радикалы полиненасыщенных жирных кислот, что проявляется в появлении хемилюминесценции (ХЛ), активируемой кумарином С-525 [4]. Оказалось, что антиоксиданты подав-

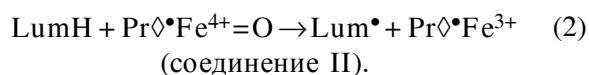
ляют как хемилюминесценцию при липидной пероксидации кардиолипина в присутствии  $H_2O_2$ , так и ХЛ при окислении люминола [4,5], и был сделан вывод, что действие антиоксидантов в организме может быть направлено не только на подавление цепных реакций липидной пероксидации, но и на снижение образования радикалов различных метаболитов и липидов биомембран при работе ферментов-пероксидаз, включая комплекс цитохрома *c* и кардиолипина [5]. Это резко расширяет круг мишеней, на которые направлено действие антиоксидантов, поскольку не только апоптоз [6] и другие виды программируемой смерти клеток, но также и образование липидных медиаторов воспаления [7] инициируются реакциями липидной пероксидации, катализируемой гемопротейнами и их комплексами с фосфолипидами. Существует значительное количество способов определения антиоксидантной активности веществ [8], среди которых наибольшей чувствительностью обладают методики, основанные на хемилюминесценции [9–21]. Достаточно распространенными являются хемилюминесцентные реакции с участием пероксида водорода и какой-

Сокращение: ХЛ – хемилюминесценция.

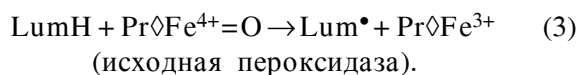
либо пероксидазы, наиболее изученной из которых является пероксидаза из корней хрена [16,22–24]. Механизм хемилюминесцентных реакций при окислении люминола пероксидазой рассмотрен в работе [22], проведенной с использованием методов «стоп-флоу», включая спектроскопию и хемилюминесценцию. Реакция начинается со взаимодействия пероксида водорода с активным центром пероксидазы  $\diamond\text{Fe}^{3+}$ , при этом образуется соединение I, которое содержит оксоферрильный центр  $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$  и порфириновый катион-радикал  $\diamond^*$ , быстро переходящий в радикал белковой части фермента  $\text{R}^*$ :



На следующей стадии происходит одноэлектронное восстановление соединения I субстратом  $\text{RH}$  с образованием соединения II ( $\text{Pr}\diamond\text{Fe}^{4+}=\text{O}$  либо  $\text{Pr}\diamond^*\text{Fe}^{3+}$ ):



И соединение I, и соединение II являются сильными окислителями с редокс-потенциалом, составляющим примерно +1 В. Следующее одноэлектронное восстановление субстратом возвращает молекулу фермента в исходное состояние [4]:



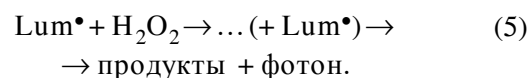
Стоит отметить, что для всех изученных систем константа скорости реакции (3) заметно выше константы скорости реакции (2), поэтому весь процесс практически необратим.

Окисление люминола сильным окислителем, радикалом, формой металла переменной валентности или соединениями I (реакция 2) или I (реакция 3) сопровождается хемилюминесценцией именно из-за первичного образования люминол-радикала [22] с последующим образованием возбужденной молекулы продукта окисления – аминифталата, что сопровождается эмиссией фотона. Вероятно, общая схема реакции может быть записана в форме, предложенной авторами работы [22]:



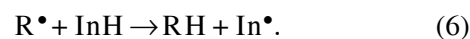
Очевидно, что реакция существенно сложнее хотя бы потому, что тримолекулярных реакций на самом деле не бывает, и первая стадия реакции должна представлять собой взаимодей-

ствии радикала люминола с пероксидом водорода, а в целом схема реакций будет выглядеть так:

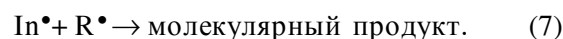


Более детально схема заключительной стадии реакций радикала люминола, сопровождающихся испусканием фотона, рассмотрена в обзоре [10].

Как известно, антиоксидантами называют вещества, способные ингибировать процессы свободнорадикального окисления. Механизм действия антиоксидантов может быть разным, но в настоящей работе мы остановимся только на антиоксидантах – ловушках радикалов, первоначальное действие которых основано на реакции:



Радикал антиоксиданта может вступать в различные реакции, от которых зависит общий антиоксидантный эффект. Один из вариантов – это взаимодействие с еще одной молекулой радикала  $\text{R}^*$ :



В результате реакций (6) и (7) одна молекула антиоксиданта  $\text{InH}$  перехватывает два радикала. Константа скорости реакции (6) служит мерой антиоксидантной активности конкретного вещества, тогда как применительно к растительным экстрактам и плазме крови под словами «антиоксидантная активность» часто подразумевают общее количество радикалов, перехватываемых в данной системе за определенное время [25,26]. Мы предлагаем использовать термин «содержание антиоксиданта» (antioxidant capacity), когда речь идет не об активности антиоксиданта, а о количестве радикалов, которое будет перехвачено антиоксидантами, содержащимися в исследуемой системе.

Основные методики определения содержания антиоксидантов рассмотрены в работе [8]. Основа хемилюминесцентной методики определения содержания антиоксидантов в биологических образцах заложена в работах Э. Лисси с соавторами [12,13,27]. Были описаны два подхода для измерения этой величины. Метод TRAP (Total Radical-trapping Potential) основан на измерении времени индукции ХЛ и подходит для изучения «сильных» антиоксидантов, таких как тролокс, аскорбиновая или мочевиная кислота. В методе TAR (Total Antioxidant Reactivity) определяется снижение стационарной концен-

трации свободных радикалов, которая устанавливается через некоторое время после введения антиоксиданта, что характерно для «слабых» антиоксидантов. Количественной мерой «силы» антиоксиданта может служить величина  $k_6$  – константа скорости реакции (6) [5]. Методом анализа кривых люминолзависимой хемилюминесценции была в частности определена общая антиоксидантная емкость в лекарственном растительном сырье [28].

Исследование формы кинетических кривых хемилюминесценции позволяет разобраться в механизме протекания реакций, заканчивающихся испусканием фотона [11,15,29]. В частности, для уточнения схемы реакций, в которых участвует антиоксидант, и определения констант скоростей этих реакций нами был использован метод математического моделирования кинетики реакций [11]. В настоящей работе проведено изучение кинетики хемилюминесценции и математическое моделирование кинетики реакций окисления люминола пероксидом водорода, катализируемом пероксидазой хрена, в отсутствие и в присутствии антиоксидантов (аскорбиновая кислота, тролокс, кверцетин и мексидол), с целью уточнения механизма реакций пероксидазного цикла и действия антиоксидантов, а также определения констант скоростей этих реакций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фосфатный буферный раствор с концентрацией  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 ммоль/л готовили растворением навески  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в дистиллированной воде. Необходимое значение pH 7,4 получали добавлением твердого КОН, контролируя кислотность при помощи pH-метра pH 211 (Hanna Instruments, США). Раствор люминола готовили растворением навески порошка люминола ( $M = 177,16$ , Sigma, США) в бидистиллированной воде и доводили до pH 7,5 с помощью твердого КОН. Пероксид водорода с концентрацией 0,1 моль/л готовили растворением 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Aldrich, США) в фосфатном буферном растворе, рабочие растворы пероксида водорода готовили разбавлением дистиллированной водой.

Исходный раствор пероксидазы из корней хрена (Sigma, США) с концентрацией  $1,8 \times 10^{-5}$  моль/л был приготовлен растворением навески в 1,0 мл 0,1 М  $\text{NaNO}_3$  и доведен до 5,0 мл фосфатным буферным раствором с pH 7,0. Растворы пероксидазы корней хрена меньшей концентрации готовили разбавлением исходного раствора. Растворы тролокса и кверцетина с концентрацией каждого 0,1 М гото-

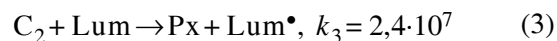
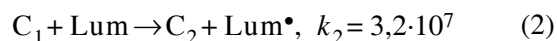
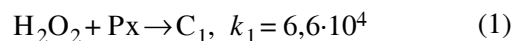
вили растворением навески в метаноле; растворы с рабочими концентрациями получали разбавлением исходного раствора в дистиллированной воде. Метанольный раствор сохранял свою активность длительное время, водные растворы готовили непосредственно в день эксперимента. Растворы аскорбата натрия (натриевая соль  $\beta$ -лактон-2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты, Fluka, Швеция) с рабочими концентрациями готовили растворением навески в дистиллированной воде в день эксперимента.

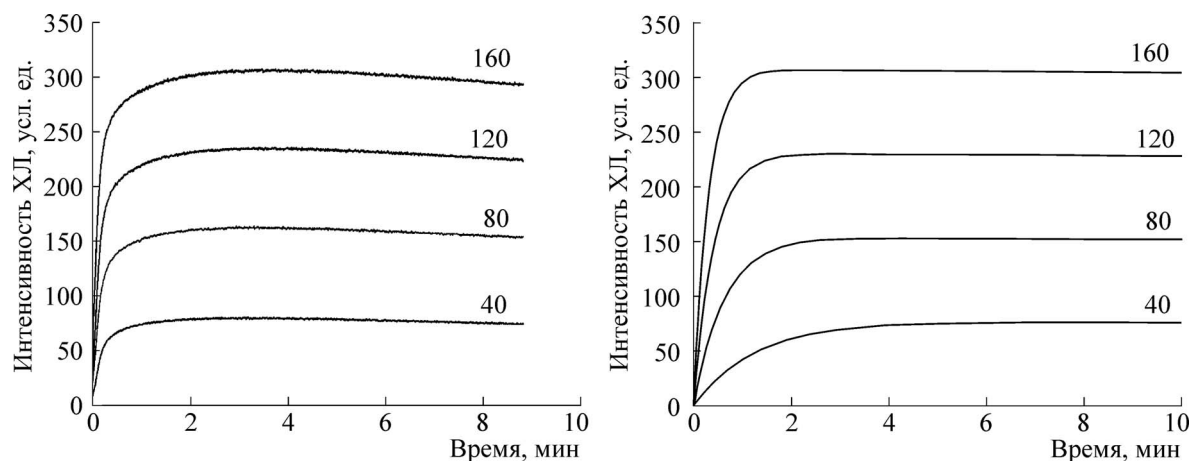
Для проведения кинетических экспериментов к раствору пероксидазы в фосфатном буфере добавляли требуемое количество раствора люминола, затем раствор необходимого антиоксиданта и пероксид водорода. Суммарный объем смеси составлял 1,000 мл. Измерение хемилюминесценции проводили на хемилюминометре «Lum-5773» («ДИСофт», Россия, www.chemilum.ru) при температуре 20°C. Для сопряжения компьютера и хемилюминометра использовали программный продукт PowerGraph (версия 3.3) [30] [31–35]. Полученные кинетические кривые впоследствии использовали для проведения математического моделирования химических процессов в системе.

Моделирование проводили с помощью компьютерной программы Kinetic Analyser. В ходе моделирования решали прямую задачу – задавали определенный набор реакций, и при заданных начальных концентрациях реагентов варьировали значения соответствующих констант скоростей реакций, добиваясь максимальной сходимости расчетной кинетической кривой с экспериментальной.

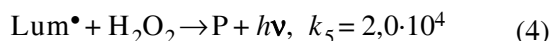
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом моделирования было построение базовой модели в системе пероксидаза– $\text{H}_2\text{O}_2$ –люминол. За основу были взяты реакции (1)–(3) и (5) (см. выше). Была измерена кинетика хемилюминесценции при различных концентрациях пероксида водорода (кривые хемилюминесценции приведены на рис. 1). При заданных начальных концентрациях участников реакций были подобраны константы скоростей реакций, при которых расчетные кривые были ближе всего к экспериментальным. В упрощенном виде схему реакций можно представить себе следующим образом:





**Рис. 1.** Сопоставление данных моделирования кинетики ХЛ в системе пероксидаза– $\text{H}_2\text{O}_2$ –люминол с экспериментальными данными при различных концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Концентрации люминола и пероксидазы – 60 мкМ и 6 нМ соответственно. Концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  указаны на рисунке. Слева – экспериментальные кривые ХЛ, справа – расчетные (реакции (1)–(3), (5)).

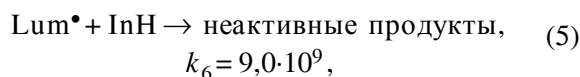


где Рх – пероксидаза,  $\text{C}_1$  и  $\text{C}_2$  – соединения 1 и 2,  $\text{Lum}^\bullet$  – продукт окисления люминола, люминол-радикал; константы скоростей даны в  $\text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ . По данным работы [22] величина  $k_2 = 2,3 \cdot 10^6$ ,  $k_3 = 7,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ , что несколько отличается от полученных нами данных, в основном из-за различий условий проведения экспериментов (разные начальные концентрации веществ, а главное – различные рН: 8,0 в работе [22] и 7,4 в настоящем исследовании).

Как видно из рис. 1, предложенная модель не вполне точно описывает начальный участок кривых ХЛ: если при концентрации пероксида водорода 120 мкМ начальные участки экспериментальной и расчетной кривых почти совпадают, то при уменьшении концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  разница увеличивается. По-видимому, реальная схема окисления люминола представляет собой многостадийный процесс и, таким образом, в предложенной схеме,  $k_4$  представляет собой эффективную константу, зависящую от концентраций исходных реагентов. Этим же частично объясняются различия между нашими результатами и данными работы [22], где начальные концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  были другими. Но с учетом поставленных целей предложенную базовую модель можно считать удовлетворительной, поскольку она достаточно хорошо согласуется с экспериментальными данными при начальных концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  80–120 мкМ, которые были использованы в данной работе при исследовании влияния антиоксидантов.

На рис. 2 показано влияние различных концентраций антиоксидантов на развитие кривых

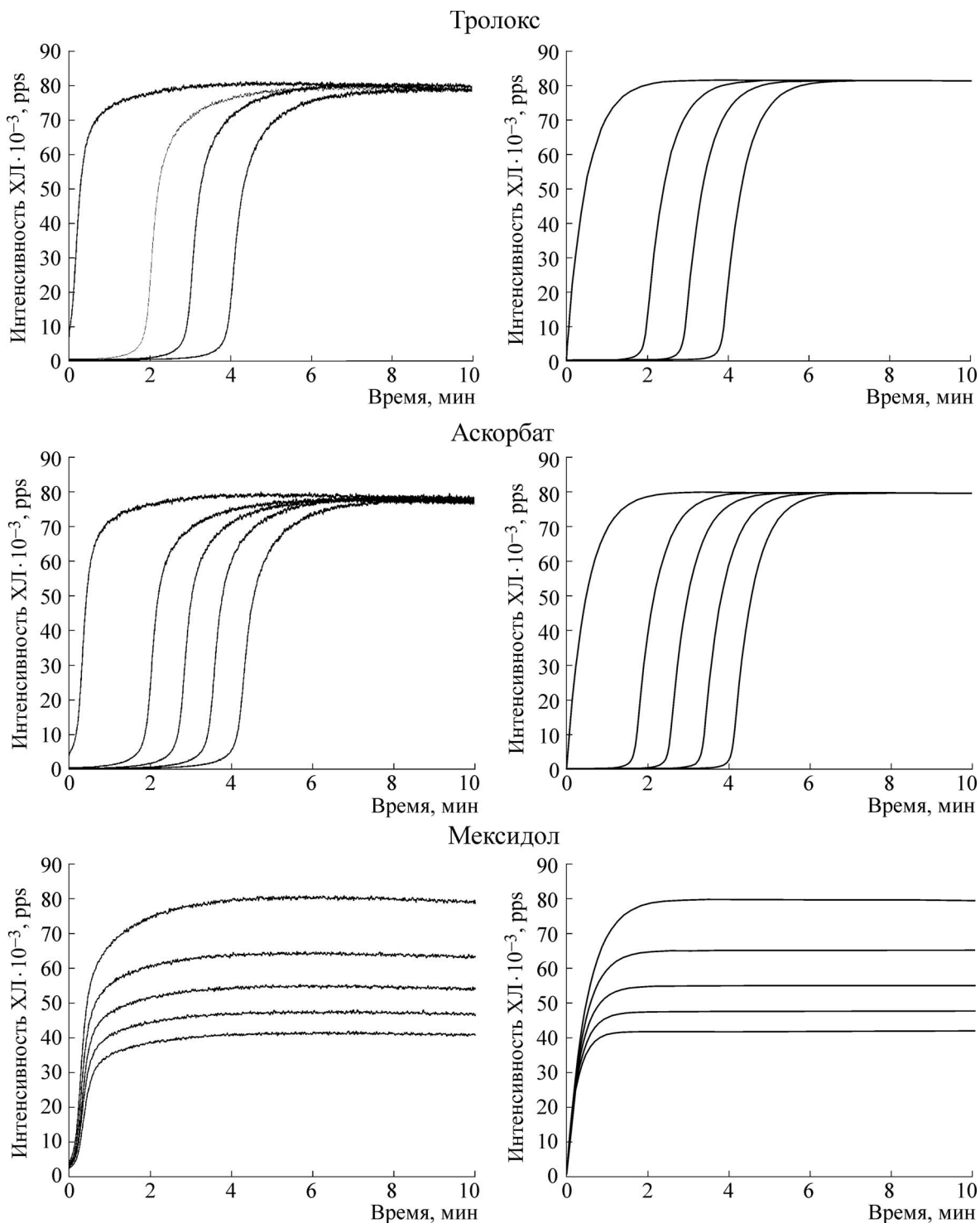
ХЛ в системе пероксидаза– $\text{H}_2\text{O}_2$ –люминол. Для моделирования антиоксидантного действия тролокса, аскорбата и мексидола к базовой модели была добавлена следующая реакция:



где InH – молекула антиоксиданта. Химическая составляющая такой схемы может заключаться во взаимодействии фенольной группы с радикалом люминола, приводящем к образованию молекулярного производного люминола и малоактивного фенольного радикала тролокса, неспособного к продолжению радикальной цепи реакции. На рис. 2 приведено сопоставление экспериментальных данных для разных антиоксидантов с результатами моделирования.

Наилучшее соответствие между экспериментальными и рассчитанными кривыми ХЛ получено при следующих значениях константы  $k_5$ : для тролокса –  $9,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ , для аскорбата –  $1,0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ , для мексидола –  $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ .

Оптимальное значение константы скорости  $k_5$  для аскорбата было немного больше, чем для тролокса. В случае мексидола латентный период развития ХЛ как таковой отсутствует, но сама хемилюминесценция уменьшается. Это может означать, что скорость взаимодействия мексидола с антиоксидантами недостаточна, чтобы полностью подавить развитие ХЛ в самом начале, однако в ходе реакции часть радикалов нейтрализуется антиоксидантом, что и вызывает уменьшение ХЛ [5].



**Рис. 2.** Сопоставление экспериментальных и расчетных кинетических кривых в системе пероксидаза–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–люминол в присутствии различных концентраций антиоксидантов (мкМ). Концентрации пероксидазы, пероксида водорода и люминола составляют 4 нМ, 100 мкМ и 40 мкМ соответственно. Концентрации тролокса и аскорбата (слева направо) 0; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 мкМ, концентрации мексидола (сверху вниз) 0, 2, 4, 6 мкМ. Слева – экспериментальные кривые ХЛ, справа – расчетные (реакции (1)–(3), (5), (8)).

Из схемы реакций следует, что интенсивность хемилюминесценции  $I_{CL}$  прямо пропор-

циональна скорости реакции (4) и, следовательно, концентрации радикала люминола Lum<sup>•</sup>:

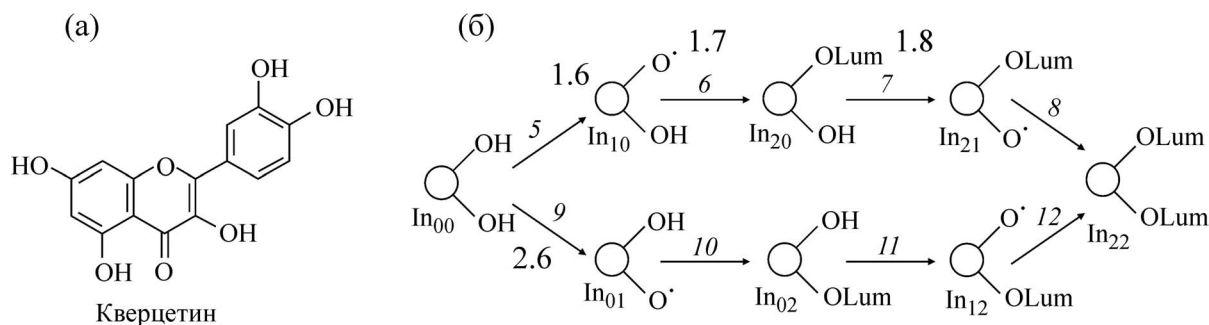


Рис. 3. Структурная формула кверцетина (а) и схема превращений молекулы антиоксиданта с двумя реакционными центрами, использованная при моделировании антиоксидантного действия кверцетина (б).

$$I_{CL} = v_4 = k_4[\text{Lum}^\bullet][\text{H}_2\text{O}_2].$$

Скорость накопления радикалов люминола во всей реакционной системе (1)–(4) равна нулю при стационарной концентрации радикалов люминола  $[\text{Lum}^\bullet]$ :

$$\frac{d[\text{Lum}^\bullet]}{dt} = k_2[\text{C}_1][\text{Lum}] + k_3[\text{C}_2][\text{Lum}] - k_4[\text{Lum}^\bullet][\text{H}_2\text{O}_2] - k_5[\text{Lum}^\bullet][\text{InH}] = 0.$$

Из этого следует:

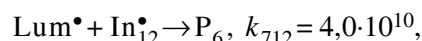
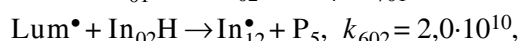
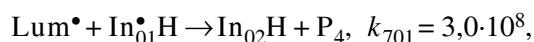
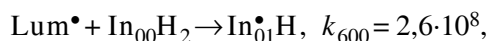
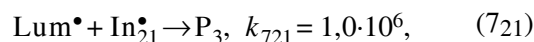
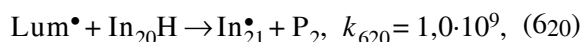
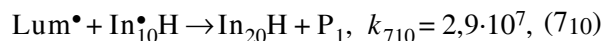
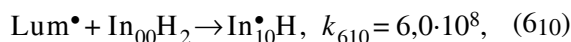
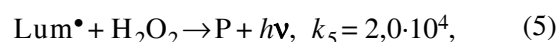
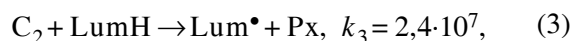
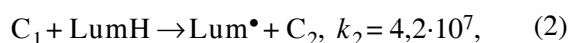
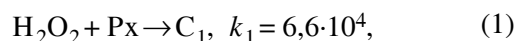
$$[\text{Lum}^\bullet] = [\text{Lum}] \frac{k_2[\text{C}_1] + k_3[\text{C}_2]}{k_4[\text{H}_2\text{O}_2] + k_5[\text{InH}]} = 0.$$

Видно, что  $[\text{Lum}^\bullet]$  (и, следовательно,  $I_{CL}$ ) уменьшается при увеличении концентрации «слабого» антиоксиданта и также зависит от его активности ( $k_5$ ).

Моделирование антиоксидантного действия кверцетина представляется наиболее интересным среди рассмотренных антиоксидантов, поскольку этот флавоноид (полифенол) имеет пять групп  $\text{OH}$ -, способных восстанавливать радикал (рис. 3а).

Заметим, что каждый из пяти центров может вступать в две последовательные реакции (типа реакций 5 и 6 на схеме, представленной на рис. 3б), причем соответствующие константы скорости реакции взаимодействия с радикалами могут быть разными. Проводить моделирование, принимая во внимание все эти реакции, практически невозможно. В конечном итоге мы использовали модель, согласно которой имеются всего два типа реакционных центров, каждый из которых может последовательно нейтрализовать два радикала (рис. 3б). Базовые реакции и константы скорости были такими же, как ранее (реакции (1)–(3) и (5)).

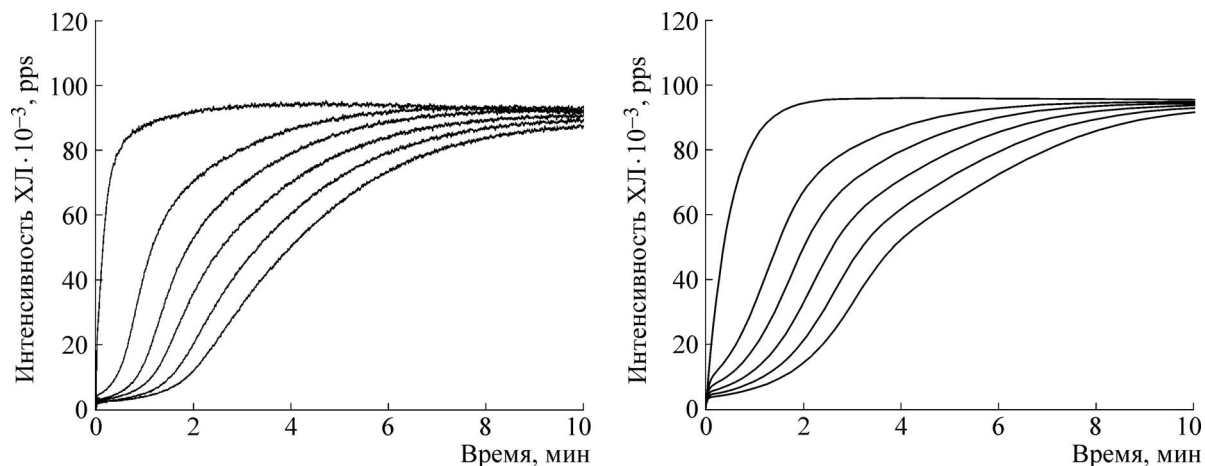
Схема реакций в используемой модели, а также подобранные константы скоростей реакций ( $\text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ) приведены ниже:



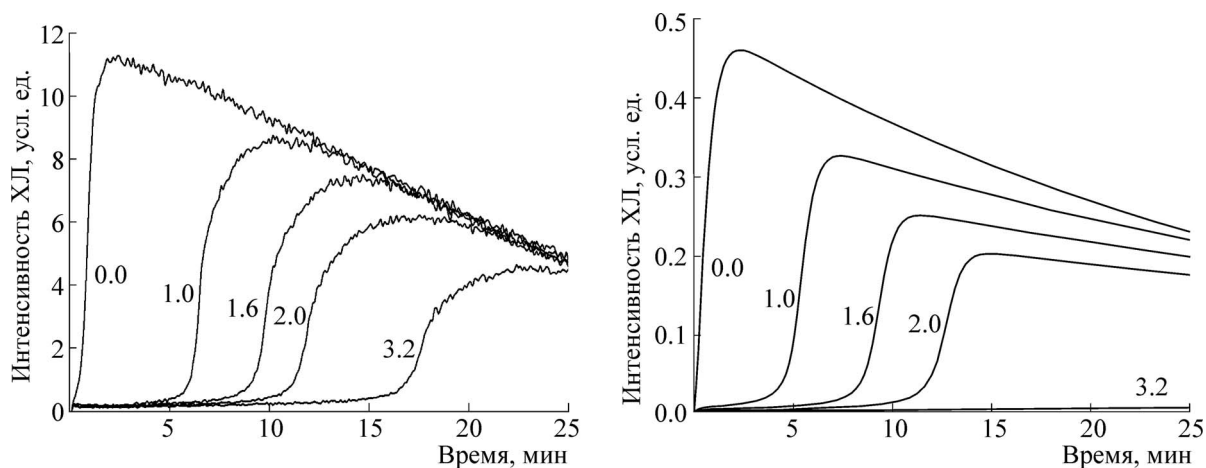
где  $\text{P}_1$ – $\text{P}_6$  – молекулярные продукты, не принимающие участия в дальнейших реакциях.

На рис. 4 сопоставлены экспериментальные и расчетные кинетические кривые хемилюминесценции. Видно, что они очень похожи друг на друга.

Во всех случаях, рассмотренных выше, предполагается, что молекула антиоксиданта реагирует с радикалом субстрата пероксидазной реакции. Между тем в пероксидажном цикле образуются промежуточные формы фермента-пероксидазы (соединения I и II), которые тоже содержат неспаренные электроны и поэтому теоретически могут захватываться антиоксидантами так же, как и  $\text{Lum}^\bullet$ , что приведет к снижению хемилюминесценции. Иначе говоря, нельзя исключить возможность конкурентного



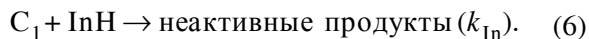
**Рис. 4.** Сопоставление экспериментальных и расчетных кинетических кривых в системе пероксидаза– $\text{H}_2\text{O}_2$ –люминол в присутствии различных концентраций кверцетина (мкМ). Концентрации пероксидазы, пероксида водорода и люминола составляют 4 нМ, 100 мкМ и 40 мкМ соответственно; концентрации кверцетина (слева направо) 0; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 мкМ. Слева – экспериментальные кривые ХЛ, справа – расчетные.



**Рис. 5.** Влияние начальной концентрации антиоксиданта (тролокс) на кинетику хемилюминесценции при его взаимодействии с участниками пероксидазного цикла соединением I и/или соединением II. Слева – экспериментальные кривые ХЛ, справа – расчетные (реакции (1)–(4), (6)). Концентрации пероксидазы, пероксида водорода и люминола составляют 4 нМ, 5 мкМ и 25 мкМ соответственно. Концентрации тролокса указаны в мкМ.

ингибирования пероксидазной реакции антиоксидантами.

Таким образом, принципиальным является вопрос, с какими именно участниками пероксидазной реакции – радикалами фермента или субстрата – взаимодействует антиоксидант. Для ответа на этот вопрос было проведено математическое моделирование антиоксидантного действия, в котором к базовой модели пероксидазных реакций (реакции (1)–(3)) была добавлена реакция



На рис. 5 сопоставлены экспериментальные и теоретические кривые хемилюминесценции, полученные в системе реакций ((1)–(4), (6)). Видно, что хотя в этих опытах были использованы более низкие концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (что приводило к снижению хемилюминесценции в силу потребления  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), добавление антиоксиданта, как и в опытах с тролоксом, представленным на рис. 2), приводило к появлению латентного периода на кривых ХЛ, причем как в опыте, так и на рассчитанной кривой. Однако после завершения латентного периода (антиоксидант заканчивается) свечение выходило на тот же уровень, что и в отсутствие антиоксиданта, лишь в опыте, но не на графике с рассчитанной

кривой (рис. 5). Причина того, что при расчете по схеме, согласно которой антиоксидант захватывает радикалы пероксидазы (реакция б), уровень хемилюминесценции после разрушения антиоксиданта не выходит на уровень, который был бы в отсутствие антиоксиданта, очевидна. В реакции (б) разрушается не только антиоксидант, но и фермент, и после окисления всего антиоксиданта концентрация пероксидазы, а следовательно, и скорость пероксидазной реакции будет тем меньше, чем больше антиоксиданта было добавлено. При концентрации антиоксиданта, близкой к концентрации пероксидазы (3,2 и 3,75 мкМ в нашей модели), длительность латентного периода превышает время измерения, а при равенстве концентраций становится бесконечной одновременно с нулевой интенсивностью свечения. Все это совершенно не соответствует экспериментальным данным.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В организме человека и животных основной источник первичных радикалов супероксида – это митохондрии и цитоплазматические мембраны, но радикалы органических молекул (в первую очередь, липидов) образуются в реакциях, катализируемых пероксидазами, и прежде всего – комплексом цитохрома *c* с кардиолипином в митохондриях и с фосфатидилсеринном – в цитоплазматических мембранах. Антиоксиданты, содержащиеся в продуктах питания или в биологически активных добавках, не только обрывают цепи перекисного окисления липидов в биологических мембранах, но и могут влиять на образование радикалов в реакциях, катализируемых пероксидазами. Механизм реакций образования радикалов пероксидазами в общих чертах известен, но о механизме действия различных антиоксидантов на радикалпродуцирующую активность пероксидаз известно очень мало. В настоящей работе мы провели экспериментальное изучение кинетики реакций и математическое моделирование кинетики реакций в модельной системе – окисление люминола пероксидом водорода, катализируемом пероксидазой хрена, – с целью уточнения механизма реакций пероксидазного цикла и действия антиоксидантов, а также определения констант скоростей этих реакций.

Сравнение кинетических кривых хемилюминесценции с результатом расчетов (рис. 1, 2) показало, что действие тролокса, аскорбата и мексидола обусловлено реакцией радикала люминола с молекулой ингибитора (константы скорости  $1,0 \cdot 10^{10}$ ,  $9,0 \cdot 10^9$  и  $2,3 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>мин<sup>-1</sup> соответственно). В случае кверцетина задача моде-

лирования оказалась более сложной, так как антиоксидант содержит пять групп гидроксила, способных реагировать с радикалами, вступая в две последовательные реакции. Антирадикальное действие кверцетина было описано упрощенной схемой из восьми реакций, основанной на наличии всего двух основных реакционных центров в молекуле, каждый из которых взаимодействует с двумя радикалами (рис. 3), при этом были определены константы скоростей всех реакций и получено хорошее соответствие экспериментальных и рассчитанных кривых кинетики хемилюминесценции (рис. 4).

Все эти результаты были получены в предположении, что антиоксиданты реагируют с радикалами субстрата реакции – люминола. Но вполне разумно и иное предположение, что молекула антиоксиданта взаимодействует не с радикалом продукта реакции, а с молекулами фермента в пероксидажном цикле (соединения I и II). Это, однако, не подтвердилось: расчетные кривые отличались от экспериментальных, что можно объяснить инактивацией пероксидазы при реакции радикалов фермента с антиоксидантом, которая предполагается в модели, но не происходит в действительности.

В живых клетках образование радикалов пероксидазами (прежде всего комплексами цитохрома *c* с кардиолипином и фосфатидилсеринном) и его последствия (например, апоптоз) может, таким образом, быть заторможено не только путем ингибирования самого фермента (см. например, работы [36–40]), но и антиоксидантами – перехватчиками свободных радикалов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00375).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, Москва, 1972).
2. V. E. Kagan, V. A. Tyurin, J. Jiang, et al., *Nature Chem. Biol.* **1**, 223 (2005).
3. N. A. Belikova, Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, et al., *Biochemistry* **45** (15), 4998 (2006).
4. Е. М. Демин, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия* **49** (5), 354 (2008).
5. Д. Ю. Измайлов, Е. М. Демин и Ю. А. Владимиров, *Фотобиология и фотомедицина* **7** (2), 70 (2011).
6. V. E. Kagan, N. A. Bayir, N. A. Belikova, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **46** (11), 1439 (2009).
7. Y. Y. Tyurina, S. M. Poloyas, V. A. Tyurin, et al., *Nature Chemistry* **6** (6), 542 (2014).
8. В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова и Е. В. Мальцева, *Химия растительного сырья* **3**, 63 (2004).



9. Z. Cheng, G. Yan, Y. Li, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **375** (3), 376 (2003).
10. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
11. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина и Д. Ю. Измайлов, *Биофизика* **56** (6), 1081 (2011).
12. E. A. Lissi, J. Escobar, C. Pascual, et al., *Photochem. Photobiol.* **60** (5), 405 (1994).
13. E. A. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **18** (2), 153 (1995).
14. Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова, О. В. Любичкий, et al., *Вопр. мед. химии* **44** (1), 70 (1998).
15. Д. В. Магин, Д. И. Измайлов, И. Н. Попов и др., *Вопр. мед. химии* **46** (4), 419 (2000).
16. S. R. Georgetti, R. Casagrande, V. M. Di Mambro, et al., *AAPS PharmSci.* **5** (2), 111 (2003).
17. G. F. Fedorova, A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, et al., *Arkivoc* **8**, 163 (2007).
18. G. F. Fedorova, V. A. Menshov, A. V. Trofimov, et al., *Analyst* **134** (10), 2128 (2009).
19. L. Saleh and C. Plieth, *Nature Protocols* **5** (10), 1627 (2010).
20. L. Pogačnik and N. P. Ulrih, *Luminescence* **27** (6), 5050 (2012).
21. A. K. Slavova-Kazakova, S. E. Angelova, T. L. Vep-rintsev, et al., *Beilstein J. Org. Chem.* **11** (1), 1398 (2015).
22. M. J. Cormier and P. M. Prichard, *J. Biol. Chem.* **243** (18), 4706 (1968).
23. E. A. Lissi, C. Pascual, and M. D. Del Castillo, *Free Radic. Biol. Med.* **16** (6), 833 (1994).
24. A. P. Landi-Librandi, C. A. de Oliveira, A. E. Azzolini, et al., *J. Microencapsulation* **28** (4), 258 (2011).
25. Х. З. Брайнина, А. В. Иванова и Е. Н. Шарафут-динова, *Изв. вузов. Пищевая технология*, № 4, 3 (2004).
26. Г. Клебанов, Ю. Теселкин, И. Бабенкова и др., *Вестн. РАМН* **2**, 15 (1999).
27. E. A. Lissi, C. Pascual, and M. D. Del Castillo, *Free Radic. Res. Commun.* **17** (5), 299 (1992).
28. Г. К. Владимиров, Е. В. Сергунова, Д. Ю. Измайлов и др., *Вестник РГМУ*, № 2, 65 (2016).
29. Д. Ю. Измайлов и Ю. А. Владимиров, *Биол. мем-браны* **20** (4), 349 (2003).
30. Д. Ю. Измайлов, *Описание ПО «PowerGraph»* (ООО DiSoft, 2016), <http://www.powergraph.ru/soft/pgview.asp>.
31. Д. Ю. Измайлов, *Промышленные измерения. Контроль, автоматизация, диагностика*, № 4, 50 (2008).
32. Д. Ю. Измайлов, *Промышленные измерения. Контроль, автоматизация, диагностика*, № 3, 38 (2008).
33. Д. Ю. Измайлов, *Промышленные измерения. Контроль, автоматизация, диагностика*, № 2, 42 (2008).
34. Д. Ю. Измайлов, *Промышленные измерения. Контроль автоматизация диагностика*, № 1, 46 (2008).
35. Д. Ю. Измайлов, *Промышленные измерения. Контроль автоматизация диагностика*, № 3, 42 (2007).
36. J. Atkinson, A. A. Kapralov, N. Yanamala, et al., *Nature Commun.* **2**, 497 (2011).
37. G. G. Borisenko, A. A. Kapralov, V. A. Tyurin, et al., *Biochemistry* **47** (51), 13699 (2008).
38. J. Jiang, A. Bakan, A. A. Kapralov, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **71**, 221 (2014).
39. V. E. Kagan, A. Bayir, H. Bayir, et al., *Mol. Nutr. Food Res.* **53** (1), 104 (2009).
40. I. I. Vlasova, V. A. Tyurin, A. A. Kapralov, et al., *J. Biol. Chem.* **281** (21), 14554 (2006).

## The Effect of Antioxidants on the Formation of Free Radicals, the Primary Products of the Peroxidase Reaction

**D.Yu. Izmailov, E.V. Proskurnina, S.A. Shishkanov,  
G.A. Vladimirova, and Yu.A. Vladimirov**

*Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University,  
Lomonosovsky prosp. 27/1, Moscow, 119234 Russia*

Antioxidants suppress the formation of radicals by peroxidases. The comparison of the kinetic curves of chemiluminescence in the system of horseradish peroxidase/luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with the mathematical model of the reaction kinetics showed that the effect of trolox, ascorbate, and mexidol is a result of the reaction of the luminol radical with a molecule of the inhibitor (rate constants 1,0·10<sup>10</sup>, 9,0·10<sup>9</sup>, and 2,3·10<sup>5</sup> mol<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, respectively). Antiradical action of quercetin was described by eight reactions, proposed on the assumption of the existence of two reaction centers in the molecule, each reacting with two radicals. The hypothesis that the antioxidant molecule captures the enzyme intermediate radicals in peroxidase cycle, rather than the radical of the reaction product was not confirmed: the estimated curves differ from experimental point positions. Apparently, the formation of radicals by peroxidase in living cells and the subsequent events, such as apoptosis, may be prevented not only via the enzyme inhibition, but also with the antioxidants, the traps of the reaction product free radicals.

*Key words: peroxidase reaction, chemiluminescence, mathematical modelling of the kinetics*