

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ В СИСТЕМЕ ГЕНЕРАЦИИ СУПЕРОКСИДНЫХ АНИОН-РАДИКАЛОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Л.Т. Рязанцева, В.П. Октябрьский

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Высшая школа биомедицинских систем и технологий

С использованием метода математического моделирования кинетики люминолзависимой хемилюминесценции изучено действие некоторых антиоксидантов (АО) на реакцию окисления люминола супероксидными анион-радикалами, образующимися в системе ТЕМЭД-рибофлавин. Установлено, что для описания вклада антиоксидантов в изменение кинетики люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) достаточно использовать единственную реакцию взаимодействия антиоксиданта со свободным радикалом. Предложено использование константы скорости этой реакции в качестве меры «антиоксидантной активности».

Ключевые слова: кинетика хемилюминесценции, математическое моделирование, антиоксидантная активность.

В настоящее время непосредственное химическое определение радикалов невозможно, так как их нельзя выделить из-за высокой реакционной способности. Поэтому, как правило, определяют устойчивые продукты реакции, в образовании которых участвовали радикалы. Из всех существующих методов анализа радикалов только метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) позволяет не только обнаружить, но и идентифицировать определенные радикалы [1, 2]. Однако, в биосистемах из-за низкой концентрации радикалов метод ЭПР часто оказывается недостаточно чувствительным. В этой связи метод хемилюминесценции (ХЛ) обладает преимуществом: он весьма чувствителен при обнаружении именно высокореакционных радикалов и обычно не связан с изменением направления процессов в биосистемах. В настоящее время в ХЛ-методах определения антиоксидантной активности или количества антиоксидантов используются характеристики ХЛ-кривой – интенсивность свечения, светосумма, длительность латентного периода [3, 4]. Но ни один из этих параметров не может быть использован в качестве универсальной меры активности любых антиоксидантов, так как разные антиоксиданты по-

разному изменяют параметры хемилюминесценции. В этой связи предлагаем в качестве метода оценки антиоксидантного потенциала различных веществ использовать метод математического моделирования кинетики ХЛ-реакции окисления люминола супероксидными анион-радикалами, образующимися в системе ТЕМЭД-рибофлавин.

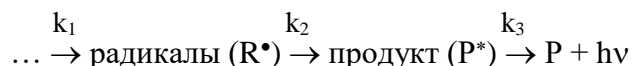
Целью нашего исследования явилось изучение влияния антиоксидантов различной природы на реакцию окисления люминола супероксидными анион-радикалами с применением метода математического моделирования.

Материал и методы. В работе были использованы следующие реактивы: люминол (AppliChem, Германия), N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД, 99%, Acros organics, Франция), рибофлавин (98%, Biochem, Франция), этилендиаминтетраацетат натрия (99%, AppliChem, Германия), α -токоферола ацетат (97%, BioChemica, Италия), тиамин хлорид (99%, Merck, Германия), пиридоксина гидрохлорид (98%, Serva, Германия), аскорбиновая кислота (99%, Россия), ретинола ацетат (1350 ед/мг, AppliChem, Германия).

Регистрацию свечения в реакции образования супероксидных анион-радикалов осуществляли на биохемилюминометре БХЛ-06М [5]. Чувствительность прибора составляла 200 фотонов/с. В кювету хемилюминометра последовательно вносили 0,6 мл Na-фосфатного буфера (0,05 моль/л, рН 8,3), 0,1 мл раствора тетраметилэтилендиамин (0,05 моль/л) в натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (0,2 ммоль/л), 0,1 мл исследуемого образца и 0,2 мл раствора рибофлавина (0,034 ммоль/л). В контрольную пробу вносили такой же объем дистиллированной воды. Реакцию инициировали облучением лампы видимого света (100 Вт) на расстоянии 20 см в течение 60 с. За 10 с до истечения времени облучения вносили 0,1 мл раствора люминола (0,25 ммоль/л). После облучения кюветное отделение перемещали в рабочее положение перед фотокатодом фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) биохемилюминометре и регистрировали вспышку ХЛ. Регистрация излучения начиналась автоматически, до начала регистрации проходило не более 1 с. Время регистрации - 30 с. Фон (шумовой ток ФЭУ) вычитался автоматически. Записывалась зависимость интенсивности хемилюминесценции от времени. Биохемилюминометр описывает амплитуду сигнала в максимуме - I_{\max} , светосумму - S - за весь период измерения и тангенс угла наклона заднего фронта импульса излучения - $\text{tg}\alpha$. Непосредственно измеряемой БХЛ-06М величиной хемилюминесценции является напряжение, поэтому показатели S и I_{\max} измерялись в мВ (относительных единицах).

Расчет процесса, инициированного реакцией образования супероксидных анион-радикалов, осуществляли численным решением уравнений химической кинетики. Систему дифференциальных уравнений решали численно с помощью пакета MathCad 14. Задача моделирования заключалась в исследовании особенностей процесса хемилюминесценции на основе известных характеристик реакций, протекающих в системе.

Результаты и обсуждение. Схему реакций с участием радикалов, приводящих к хемилюминесценции можно представить следующим образом [6]:



Очевидно, что интенсивность ХЛ пропорциональна скорости последней реакции:

$$I_{\text{ХЛ}} = K \cdot k_3 [\text{P}^*],$$

где K – коэффициент, характеризующий чувствительность прибора к электромагнитному излучению в определенном диапазоне.

Так как скорость реакции превращения радикалов очень высока, то в системе быстро устанавливается состояние, когда скорость последующих реакций одинакова. Поэтому интенсивность свечения пропорциональна образованию радикалов:

$$I_{\text{ХЛ}} = K \cdot k_3 [\text{P}^*] = K \cdot v_1,$$

а поскольку

$$K \cdot v_1 = K \cdot k_2 [\text{P}^*],$$

то стационарная концентрация радикалов прямопропорциональна скорости их образования. Откуда стационарная концентрация радикалов определяется как:

$$[\text{P}^*] = v_1 / k_2$$

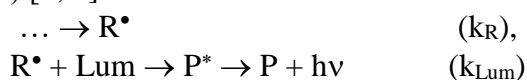
Именно стационарную концентрацию радикалов можно определить методом ЭПР. Но увеличение реактивности радикалов, то есть когда растет k_2 , а стационарная концентрация радикалов уменьшается, приводит к снижению регистрируемого ЭПР-сигнала. Получается, что из-за высоких значений k_2 методом ЭПР можно и не увидеть активные радикалы.

Интенсивность ХЛ, в отличие от ЭПР-сигнала, не зависит от активности радикалов (то есть их k_2), так как при увеличении активности радикалов и, как следствие этого, снижении стационарной концентрации радикалов их произведение не изменяется, а, следовательно, и интенсивность ХЛ остается на постоянном уровне:

$$I_{ХЛ} = K \cdot v_1 = K \cdot k_2 [P^*]$$

Поэтому ХЛ-методом можно зарегистрировать самые реактивные радикалы, и в этом – его преимущество перед другими методами регистрации радикалов в сложных биосистемах.

В присутствии люминола, используемого в качестве усилителя хемилюминесценции, кинетика моделируется двумя последовательными реакциями, в которых происходит образование супероксидных анион-радикалов ($\cdot\text{OO}^-$) и их взаимодействие с люминолом (Lum) [6, 7]:



При взаимодействии люминола с супероксидным анион-радикалом образуется 4-гидроперокси-1-окси-5-аминофталазин-4-олата, который превращается в соединение, содержащее эндопероксидную группу (2,3-перокси-ди[гидроксиметиленил]фениламин) (рис. 1, реакции 3-5). Разрыв связи между атомами кислорода в эндопероксидной группе сопровождается образованием аминфталевой кислоты в электронновозбужденном состоянии, испускающей фотон при переходе в стационарное состояние (рис. 1, реакции 6 и 7).

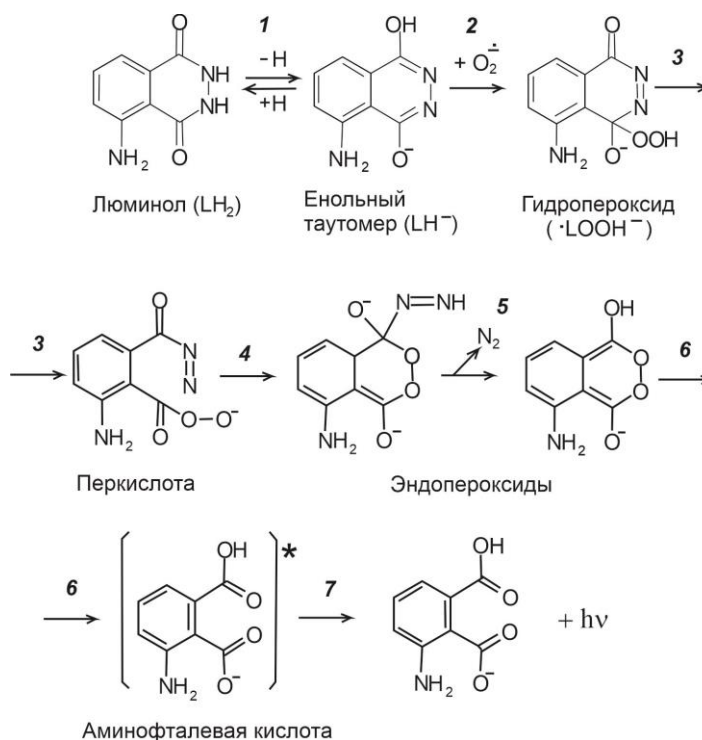


Рис. 1. Окисление люминола в присутствии супероксидного анион-радикала

Кинетика хемилюминесценции в присутствии антиоксидантов моделируется путем добавления реакции взаимодействия активной формы кислорода с антиоксидантом:



Константы скорости реакций образования супероксидных анион-радикалов и реакции их с люминолом составили $3 \pm 0,2$ и $5 \pm 0,3$ л(мкмоль·с)⁻¹.

Кинетические кривые ХЛ реакции окисления люминола супероксидными анион-радикалами, образующимися в системе ТЕМЭД-рибофлавин, в присутствии изученных АО представлены на рис. 2. Все выбранные вещества вызывали снижение интенсивности ХЛ, однако наблюдался разный характер изменений форм кривых ХЛ. Так, в присутствии α -токоферола, ретинола ацетата и тиамин хлорида изменялся угол наклона нарастания свечения, а аскорбиновая кислота и пиридоксина гидрохлорид не влияли на форму кривой.

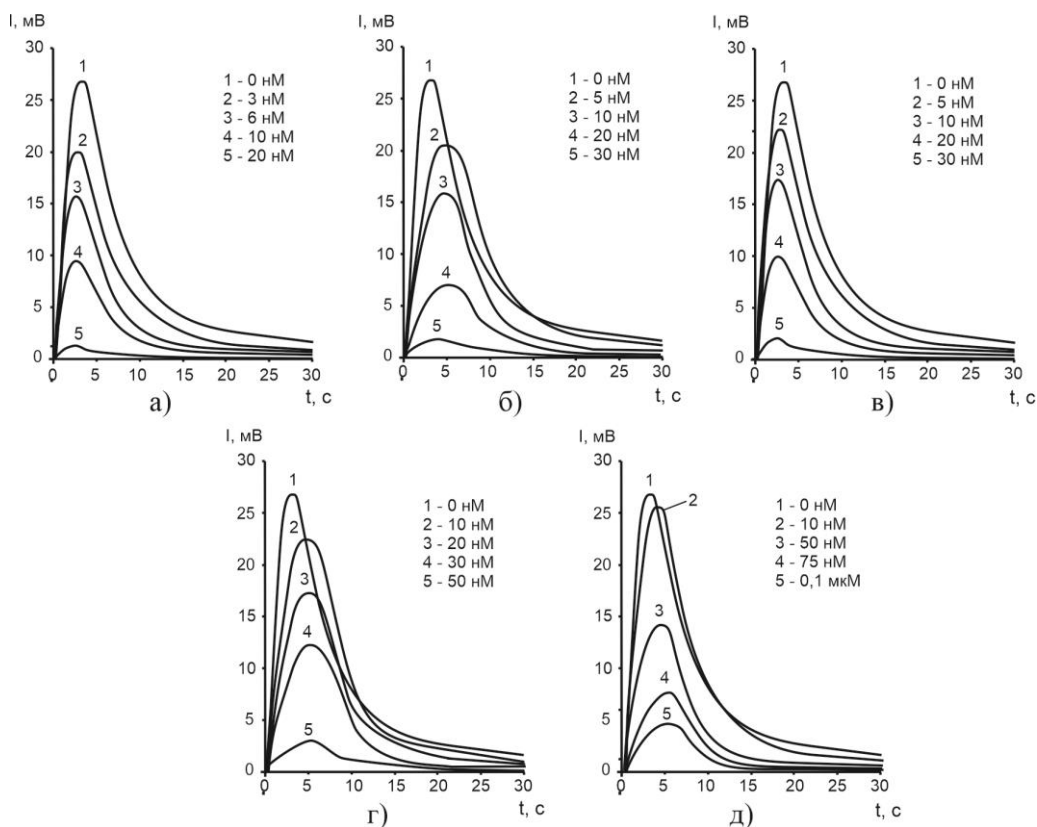


Рис. 2. Кинетика люминол-зависимой ХЛ в системе генерации супероксидных анион-радикалов в присутствии аскорбиновой кислоты (а), α -токоферола ацетата (б), пиридоксина гидрохлорида (в), ретинола ацетата (г) и тиамин хлорида (д)

По полученным кривым ХЛ рассчитали концентрации полуподавления свечения ($C_{1/2}$), которая равна половине амплитуды (A) или светосуммы (S) ХЛ-ответа (табл.). Именно эти показатели обычно учитывают при определении антиоксидантной активности вещества.

Таблица

Кинетические показатели ХЛ в присутствии АО

Антиоксидант	$C_{1/2}$ (A), нМ	$C_{1/2}$ (S), нМ	$k_{ХЛ}$, л(мкмоль·с) ⁻¹
аскорбиновая кислота	8±0,5	8,3±0,5	12,7±0,7
α-токоферола ацетат	12±0,7	16,2±0,88	10,4±0,6
пиридоксина гидрохлорид	14,6±0,85	15,3±0,8	9,0±0,5
ретинола ацетат	27±1,6	41±2,2	5,1±0,3
тиамина хлорид	51±2,9	63±3,5	3,2±0,2

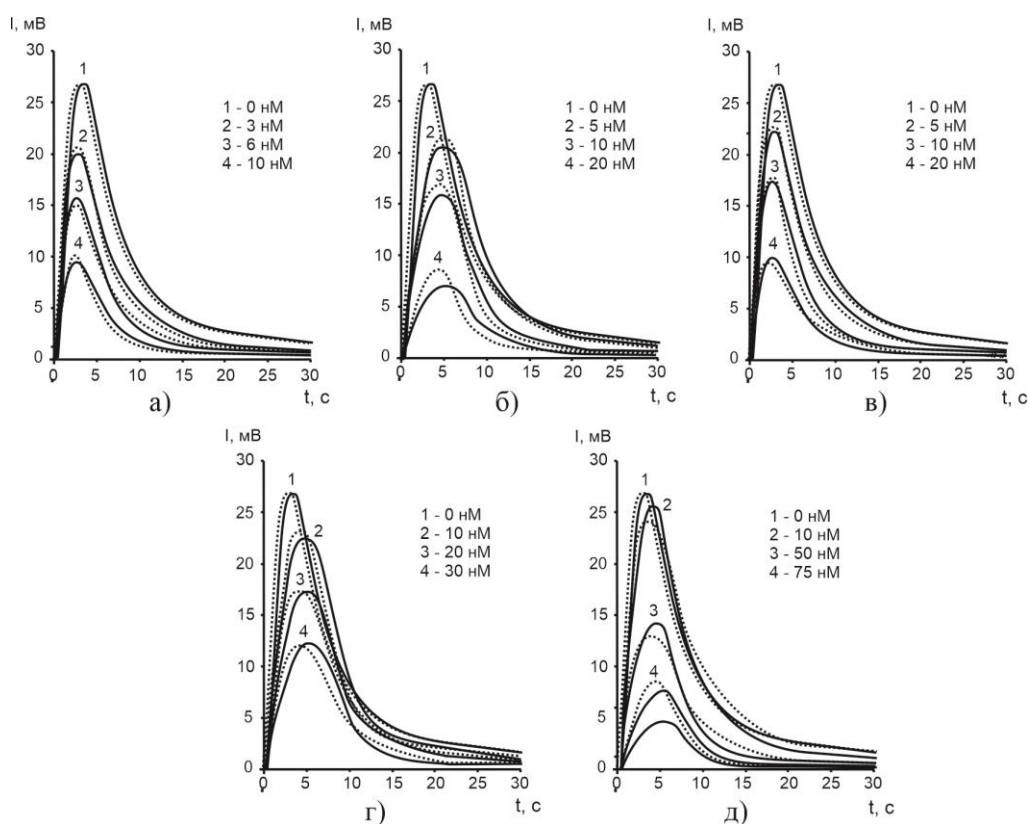


Рис. 3. Моделирование кинетики люминол-зависимой ХЛ в системе генерации супероксидных анион-радикалов в присутствии аскорбиновой кислоты (а), α-токоферола ацетата (б), пиридоксина гидрохлорида (в), ретинола ацетата (г) и тиамина хлорида (д). Пунктирными линиями изображены расчетные кривые

Из таблицы видно, что результаты, полученные по значениям амплитуд ХЛ-ответа, не коррелируют со значениями, полученными по изменению светосуммы. Поэтому наиболее адекватной характеристикой антиоксидантной активности вещества в определенных условиях можно считать константу скорости реакции взаимодействия с радикалами.

С целью оценки константы скорости реакций в модельной системе проведено математическое моделирование кинетики ХЛ в присутствии исследуемых антиоксидантов, результаты которого графически приведены на рисунке 3.

При использовании одной и той же схемы реакций для всех исследуемых веществ было получено сходство результатов математического моделирования с экспериментальными данными. Значения констант скорости реакции взаимодействия АО-витаминов с радикалом представлены в таблице. Видно, что АО оказывают разное влияние на кинетику ХЛ: степень подавления интенсивности ХЛ зависит от концентрации АО и от интенсивности реакции взаимодействия АО с радикалами, то есть от константы скорости реакции.

Из всех исследуемых веществ аскорбиновая кислота в системе генерации супероксидных анион-радикалов проявила себя как наиболее сильный антиоксидант, обладающий наибольшим значением константы скорости реакции. Близкими по значению константы скорости реакции с радикалом оказались для α -токоферола ацетата и пиридоксина гидрохлорида, что свидетельствует также о достаточно высоком их антиоксидантном потенциале. А низкие значения рассчитанных констант скорости реакции с радикалами для ретинола ацетата и тиамин хлорида характеризуют эти вещества как слабые антиоксиданты в ряду исследуемых веществ.

Таким образом, было изучено влияние ряда антиоксидантов различной природы (аскорбиновая кислота, α -токоферола ацетат, пиридоксина гидрохлорид, ретинола ацетат и тиамин хлорид) на реакцию окисления люминола супероксидным анион-радикалом с применением метода математического моделирования, которое позволяет объяснить различное влияние антиоксидантов на кинетику ХЛ и использовать расчетные кинетические параметры в качестве характеристик антиоксидантов

Список литературы

1. Блюменфельд Л.А., Тихонов А.Н. Электронный парамагнитный резонанс / Л.А. Блюменфельд, А.Н. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 9. – С. 91–99.

2. Листов М.В. Спектроскопия особенностей переноса электрона свободными радикалами в норме и патологии / М.В. Листов, А.И. Мамыкин, А.А. Рассадина // Вестник новых медицинских технологий, электронный журнал. – 2017. – № 2. – С. 259-266.

3. Artyukhov V.G. Investigation of laser irradiation influence on the some components of blood enzyme antioxidant system / V.G. Artyukhov, O.V. Basharina, L.T. Ryazantseva // Radiation Biology. Radioecology. – 2020. – Vol. 42. – №2. – Pp. 181–185.

4. Рязанцева Л.Т. Методы определения радиопротекторных свойств экстрактов из растительного сырья / Л.Т. Рязанцева, Д.П. Боталова, А.А. Павленко // Материалы XIV Международной научно-практической конференции «Комплексные проблемы техносферной безопасности». – Воронеж: Издательство ВГТУ, 2018. – С. 19–22.

5. Рязанцева Л.Т., Федянин В.И. Способ определения концентрации аскорбиновой кислоты // Патент на изобретение RU 2486509 С2, 27.06.2013. Заявка № 2010102437/15 от 25.01.2010.

6. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т.49. – С. 341-388.

7. Рязанцева Л.Т. Модулирующее действие азотного лазера на функциональные свойства нейтрофилов / Л.Т. Рязанцева // Вестник Воронежского государственного университета. – 2008. – Т.4. - №5. – С. 45-48.

Об авторах:

РЯЗАНЦЕВА Лариса Тихоновна – кандидат биологических наук, доцент высшей школы биомедицинских систем и технологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, e-mail: ryazancevalt@mail.ru

ОКТАБРЬСКИЙ Валерий Павлович – кандидат физико-математических наук, доцент высшей школы биомедицинских систем и технологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, e-mail: yokt@yandex.ru

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL
OF SUBSTANCES OF DIFFERENT NATURE IN THE SYSTEM
GENERATING SUPEROXIDE ANION RADICAL USING
THE METHOD OF MATHEMATICAL MODELING**

L.T. Ryazantseva, V.P. Oktyabrskiy

Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University
Graduate school of biomedical systems and technologies

Using the method of mathematical modeling of the kinetics of luminol-dependent chemiluminescence, the effect of certain antioxidants on the reaction of oxidation of luminol by superoxide anion radicals formed in the TEMED-Riboflavin system was studied. It was found that to describe the contribution of antioxidants to the change in the kinetics of luminol-dependent chemiluminescence (ChL), it is sufficient to use a single reaction of the interaction of an antioxidant (AO) with a free radical. It is proposed to use the rate constant of this reaction as a measure of "antioxidant activity".

Keywords: *chemiluminescence kinetics, mathematical modeling, antioxidant activity.*