

УДК 616.153.915-39-07

©Коллектив авторов

ФОТОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ.

Д. В. МАГИН¹, Д. Ю. ИЗМАЙЛОВ¹, И. Н. ПОПОВ², Г. ЛЕВИН²,
Ю. А. ВЛАДИМИРОВ¹

¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ им. Ломоносова,
Малая Пироговская ул. д. 1а, Москва 119828

² Научно-исследовательский институт антиоксидантной терапии,
Берлин, Германия.

Проведено математическое моделирование кинетики фотохемилюминесценции (ФХЛ) с участием рибофлавина в присутствии антиоксидантов – супероксиддисмутазы и аскорбиновой кислоты. Для моделирования была использована специально разработанная компьютерная программа Kinetic Analyzer. Интенсивность фотохемилюминесценции принимали пропорциональной концентрации супероксида, поскольку в системе присутствовал люцигенин. Показано, что экспериментальные кривые ФХЛ описываются достаточно точно для следующей совокупности реакций (в скобках – константы скоростей, $M^{-1} \cdot c^{-1}$): $h\nu + RH \rightarrow R\cdot + O_2^-$ ($2,3 \cdot 10^{-4} \cdot c^{-1}$); $RH + O_2^- \rightarrow R\cdot + H_2O_2$ (1000); $RH \rightarrow \dots$ ($0,005 \cdot c^{-1}$); $\cdot O_2^- + \cdot O_2^- \rightarrow \dots + \text{фотон}$ ($2 \cdot 10^5 \cdot M^{-1} \cdot c^{-1}$); $SOD + \cdot O_2^- \rightarrow SOD + H_2O_2$ ($1 \cdot 10^8$); $ASC + O_2^- \rightarrow \dots$ ($2 \cdot 10^7$). Здесь RH – рибофлавин, $\cdot O_2^-$ – супероксидный радикал, $R\cdot$ – радикал рибофлавина, SOD – супероксиддисмутаза, ASC – аскорбат.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, СОД, фотохемилюминесценция, хемилюминесценция, определение активности, математическое моделирование, метод.

ВВЕДЕНИЕ. Исследование антиоксидантной активности приобретает в настоящее время приоритетное значение. Практически все известные болезни связаны с окислительным стрессом, а, следовательно, и с нарушением антиоксидантной активности.

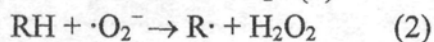
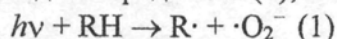
Существует много типов антиоксидантов, различных по механизму действия. Этим осложняется их определение в биологических жидкостях, например, в крови. Метод фотосенсибилизированной хемилюминесценции [1]

позволяет, по-видимому, определять различные типы антиоксидантов. Впервые он был предложен в 1987 году для определения супероксиддисмутазы [2]. С помощью этого метода было исследовано действие гипоксии на органы человека [3], был определён аскорбат в плазме крови [4], изучены антиоксидантная активность чеснока [5] и неферментных водорастворимых антиоксидантов [6], а также активность липидорастворимых антиоксидантов [7]. Позднее с помощью этого метода была обнаружена антиоксидантная активность плазмы крови, облучённой ультрафиолетом [8]. В 1997 году было доказано прямое взаимодействие супероксидного радикала с карнозином [9], а в 1998 изучены антиоксидантные свойства ликопина [10]. В этих работах процесс генерации радикалов осуществлялся благодаря освещению раствора люминола. Недавно был предложен метод определения антиоксидантной активности, в котором генерация радикалов осуществлялась путем освещения раствора рибофлавина [11].

Несмотря на успешное применение метода фотохемиллюминесценции, природа реакций в используемых системах осталась не до конца выясненной, хотя и были предложены некоторые схемы [12]. В настоящей работе было проведено математическое моделирование кинетики фотохемиллюминесценции растворов рибофлавина в присутствии супероксиддисмутазы и аскорбиновой кислоты с целью выбора минимального числа реакций, совокупность которых позволяет воспроизвести феноменологию экспериментов. Моделирование позволило также определить константы скоростей этих реакций и сопоставить их с существующими в литературе оценками.

МЕТОДИКА. Экспериментальные кривые, концентрации веществ были взяты из работы [11]. Математическое моделирование осуществлялось с помощью программы «Кинетика».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящей работе был исследован метод фотосенсибилизированной хемиллюминесценции с участием рибофлавина. Исходные уравнения реакции (1) и (2) были взяты из работы [12]. Далее, в схему реакций были добавлены уравнения разложения рибофлавина (3) и спонтанной дисмутации супероксидного радикала (4), а затем преобразованы:



где RH – рибофлавин, R· - радикал рибофлавина, ·O₂⁻ - супероксидный радикал, H₂O₂ – перекись водорода.

Концентрация рибофлавина (25 мкМ) и время реакции взяты из работы [11]. Для моделирования кинетики этой схемы было необходимо определить константы скоростей реакций (1), (2) и (3). Зависимость кинетики от константы скорости реакции (1) представлена на рисунке 1.

Для последующего моделирования была выбрана та кривая, при которой константа скорости реакции равна 2,3 × 10⁻⁴ М⁻¹·с⁻¹. Затем было исследовано влияние константы скорости реакции (2) на кинетику. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

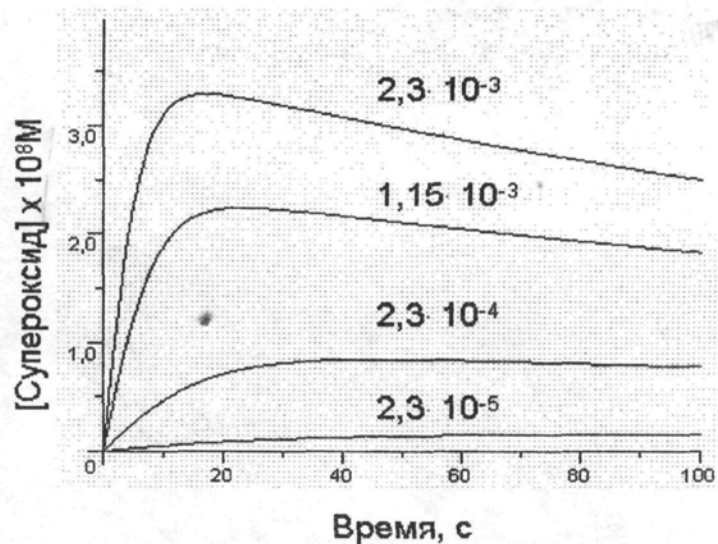


Рисунок 1.

Зависимость концентрации супероксидного радикала (кинетики фотохемилюминесценции) от константы скорости реакции превращения рибофлавина под действием света.

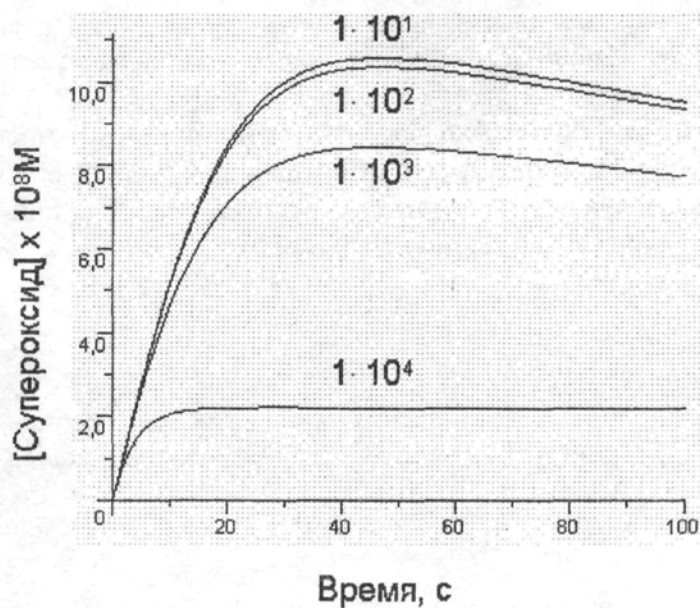


Рисунок 2.

Зависимость концентрации супероксидного радикала (кинетики фотохемилюминесценции) от константы скорости реакции взаимодействия рибофлавина с супероксидным радикалом.

На рисунке видно, что форма кривой сильно меняется при константах в промежутке от $1 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ до $1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, при дальнейшем уменьшении константы кривая практически не меняет свою форму, принимая вид экспериментальной. Поэтому в дальнейшем использовалась константа скорости,

равная $1 \times 10^{-4} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Было проведено исследование влияния константы скорости реакции (3) на кинетику кривой. Итоги видны на рисунке 3.

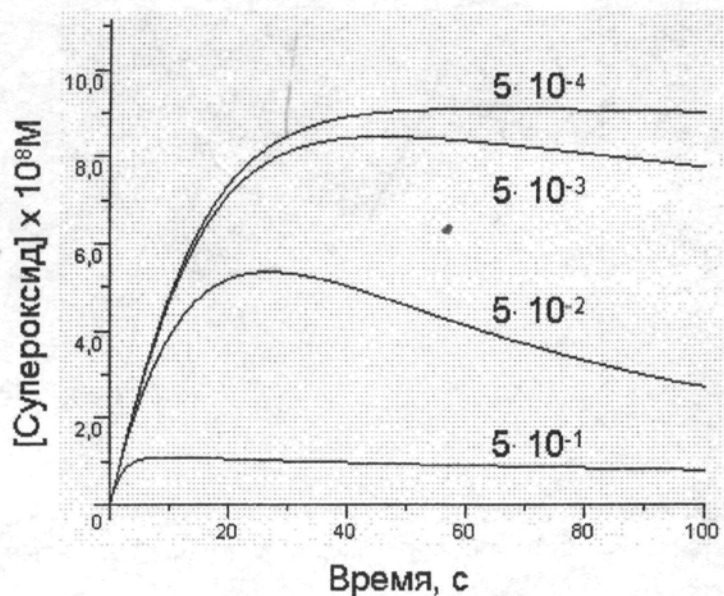


Рисунок 3.

Зависимость концентрации супероксидного радикала (кинетики фотохемилюминесценции) от константы скорости реакции разложения рибофлавина.

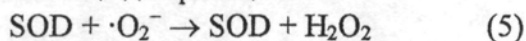
Наиболее близка к экспериментальной кривая с константой скорости реакции $5 \times 10^{-3} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В результате этих оценок для дальнейших исследований использовались следующие константы скоростей реакций, при которых модель кривой наиболее близка к экспериментальной.

Для реакции (1) $k_1 = 2,3 \cdot 10^{-4} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Для реакции (2) $k_2 = 1 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Для реакции (3) $k_3 = 2 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Для моделирования действия антиоксидантов на кинетику фотосенсибилизированной хемилюминесценции, в вышеприведённую схему было добавлено ещё две реакции:



где SOD — супероксиддисмутаза, ASC — аскорбиновая кислота.

После подбора соответствующих констант скоростей реакций (5) и (6), было проведено сравнение экспериментальных кривых кинетики фотохемилюминесценции с полученными результатами. На рисунке 4 приведено сравнение кинетики фотохемилюминесценции при добавлении различных концентраций супероксиддисмутазы. На рисунке 5 в качестве антиоксиданта была использована аскорбиновая кислота.

В результате всех исследований и сравнений подтвердилось предположение, что кинетика фотосенсибилизированной хемилюминесценции, идентичная экспериментальным кривым, описывается следующим перечнем реакций:

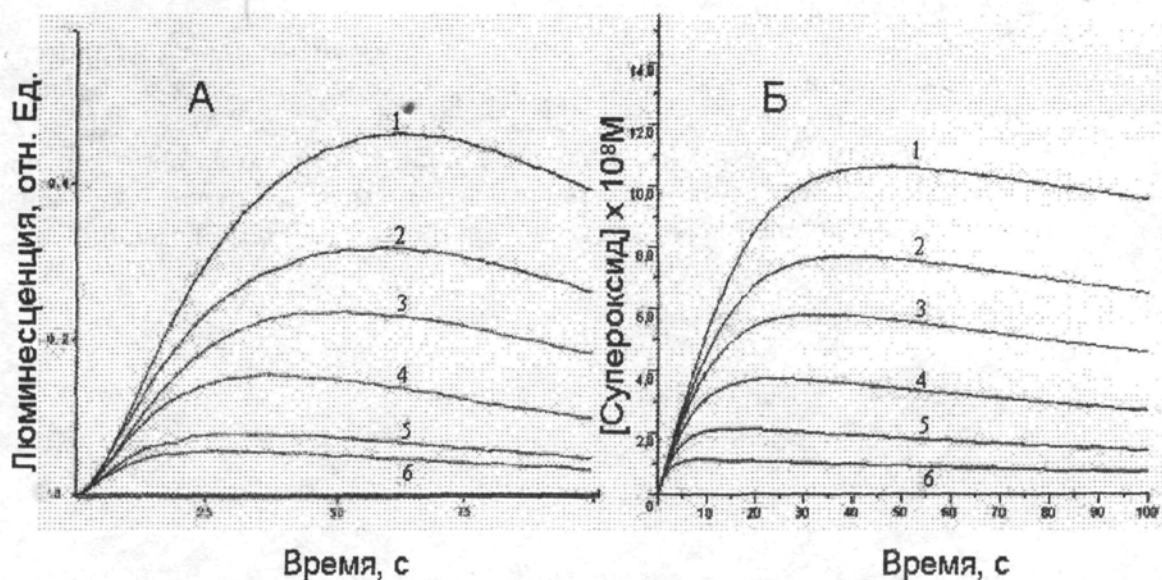
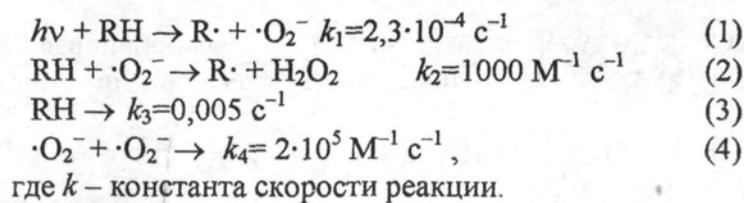


Рисунок 4.

Зависимость концентрации супероксидного радикала (кинетики фотохемилюминесценции) от количества супероксиддисмутазы (СОД) в эксперименте (А) и при математическом моделировании (Б). Конечная концентрация СОД в пробах: 1 – 0 нМ; 2 – 0,05 нМ; 3 – 0,1 нМ; 4 – 0,2 нМ; 5 – 0,4 нМ и 6 – 0,8 нМ.

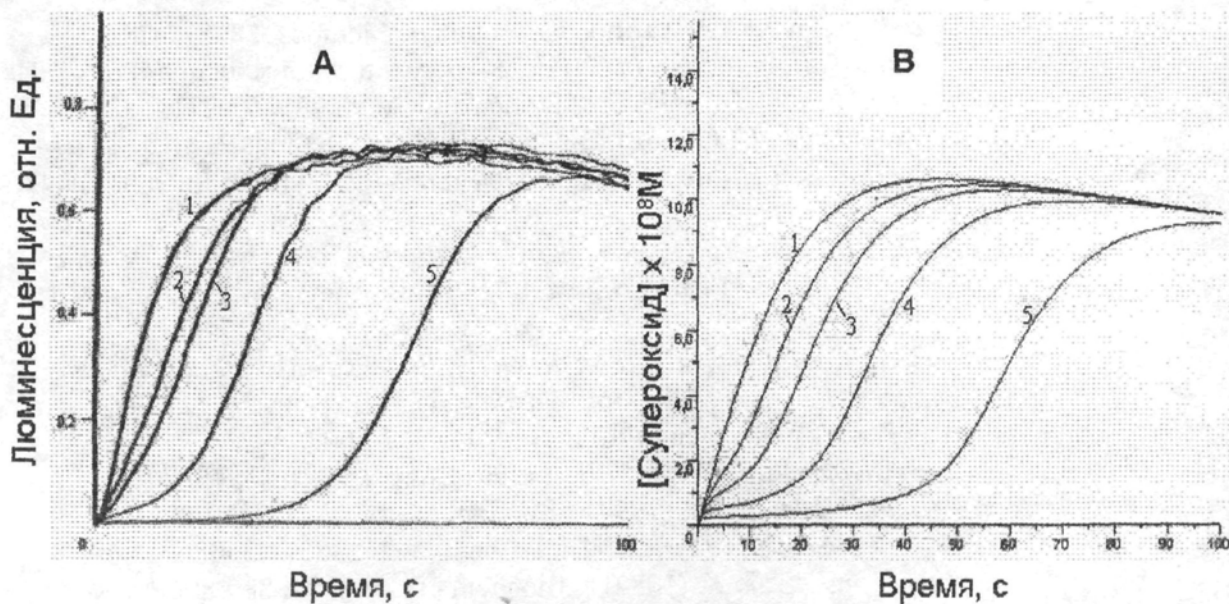
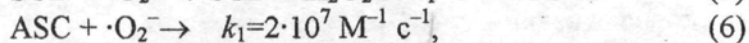
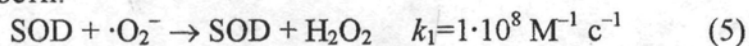


Рисунок 5.

Зависимость концентрации супероксидного радикала (кинетики фотохемилюминесценции) от количества аскорбиновой кислоты в эксперименте (А) и при математическом моделировании (Б). Конечная концентрация аскорбата в пробах: 1 – 0 мкМ; 2 – 0,03 мкМ; 3 – 0,06 мкМ; 4 – 0,12 мкМ; 5 – 0,24 мкМ.

При этих условиях, супероксиддисмутаза и аскорбиновая кислота взаимодействуют с супероксидным радикалом со следующими константами скорости:



где k – константа скорости реакции

Данные литературы о константе скорости дисмутации супероксида супероксиддисмутазой $\approx 6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [13-18] и константе скорости реакции супероксидного радикала с аскорбиновой кислотой $\approx 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [19, 20] сопоставимые полученным нами. Различия величин (примерно на один порядок) могут быть связаны с различиями в условиях эксперимента. В целом полученные данные находятся в хорошем соответствии с предложенной схемой реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров А., Литвин Ф.Ф. and Мань-ци Т. (1962) Биофизика **7**, 675-682
2. Popov I.N., Lewin G. and von Baehr R. (1987) Biomed. Biochim. Acta, **46**, 775-779
3. Popov I., Lewin G., Gabel W. and von Baehr R. (1990) Biomed. Biochim. Acta, **49**, 297-300
4. Lewin G. and Popov I. (1994) J Biochem Biophys. Methods, **28**, 277-282
5. Popov I., Blumstein A. and Lewin G. (1994) Arzneimittelforschung, **44**, 602-604
6. Popov I.N. and Lewin G. (1994) Free Radic. Biol. Med, **17**, 267-271
7. Popov I.N. and Lewin G. (1996) J. Biochem. Biophys Methods **31**, 1-8
8. Удилова Н, Попов И.Н., Левин Г.И., Владимиров Ю.А. (1997) Биофизика **42**, 187-190
9. Klebanov G.I., Teselkin Yu O., Babenkova I.V., Popov I.N., Levin G., Tyulina O.V., Boldyrev A.A. and Vladimirov Yu A. (1997) Biochem Mol Biol Int **43**, 99-106
10. Klebanov G.I., Kapitanov A.B., Teselkin Yu O., Babenkova I.V., Zhambalova B.A., Lyubitsky O.B., Nesterova O.A., Vasil'eva O.V., Popov I.N., Lewin G. and Vladimirov Yu A. (1998) Membr. Cell. Biol. **12**, 287-300
11. Магин Д.В., Левин Г.И., Попов И.Н. (1999) Вопр. мед. хим., **45**, 70-79
12. Green T.R. and Fellman J.H. (1994) Adv. Exp. Med Biol. **359**, 19-29
13. Zang L.Y. and Misra H.P. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 23601-23608
14. Takahashi M. and Asada K. (1982) J. Biochem (Tokyo), **91**, 889-896
15. Marklund S.L. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 7634-7638
16. Lavelle F., McAdam M.E., Fielden E.M. and Roberts P.B. (1977) Biochem. J. **161**, 3-11
17. Gray B. and Carmichael A.J. (1992) Biochem J **281**, 795-802

18. *Brigelius R., Hartmann H.J., Bors W., Saran M., Lengfelder E. and Weser U.* (1975) *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **356**, 739-745
19. *Gotoh N. and Niki E.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1115**, 201-207
20. *Som S., Raha C. and Chatterjee I.B.* (1983) *Acta Vitaminol. Enzymol.*, **5**, 243-250

Поступила 21.04.2000.

PHOTOCHEMILUMINESCENCE AS A TOOL TO DETERMINE THE ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BIOLOGICAL SYSTEMS. MATHEMATIC MODELING.

D.V. MAGIN¹, G. LEWIN², I.N. POPOV², D.Yu. IZMAILOV¹, Yu.A. VLADIMIROV¹

School of Basic Medicine

¹Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, Department of physico-chemical basics of medicine, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow 119828; Russia

²Research Institute for Antioxidant Therapy Co. (F.A.T. Co), Turmstr. 21, 10559 Berlin, FRG.

The mathematical modeling of the kinetics of riboflavin photochemiluminescence (PCL) in the presence of antioxidants, superoxide dismutase and ascorbic acid, has been performed. A specially developed computer program "Kinetic Analyzer" was used for the modeling. The PCL intensity of was taken as directly proportional to the superoxide concentration, because lucigenin had been added to the system. It was found, that the experimental curves of PCL virtually coincide with those calculated in the case of the following set of reactions (reaction rate constants, $M^{-1} \cdot s^{-1}$ are given in brackets): $h\nu + RH \rightarrow R \cdot + \cdot O_2^-$ ($2,3 \cdot 10^{-4} s^{-1}$); $RH + \cdot O_2^- \rightarrow R \cdot + H_2O_2$ (1000); $RH \rightarrow \dots$ (0,005 s^{-1}); $\cdot O_2^- + \cdot O_2^- \rightarrow \dots + \text{фотон}$ ($2 \cdot 10^5 M^{-1} s^{-1}$); $SOD + \cdot O_2^- \rightarrow SOD + H_2O_2$ ($1 \cdot 10^8$); $ASC + \cdot O_2^- \rightarrow \dots$ ($2 \cdot 10^7$). Here RH is , $\cdot O_2^-$ – superoxide , $R \cdot$ – riboflavin radical, SOD – superoxide dismutase, ASC – ascorbate.

Key words: superoxide dismutase, SOD, photochemiluminescence, PCL, chemiluminescence, assay, mathematic modelling, method