

ИНГИБИРОВАНИЕ СЫВОРОТОЧНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ ОКИСЛЕНИЯ ЛЮМИНОЛА В ПРИСУТСТВИИ ГЕМОГЛОБИНА И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Ю.О.ТЕСЕЛКИН, И.В.БАБЕНКОВА, О.Б.ЛЮБИЦКИЙ, Г.И.КЛЕБАНОВ,
Ю.А.ВЛАДИМИРОВ

Кафедра биофизики Российского государственного медицинского университета, 117869, Москва,
ул. Островитянова, д. 1

Изучено влияние сыворотки крови человека и отдельных сывороточных антиоксидантов, таких как аскорбат, α -токоферол, урат, альбумин, трансферрин и церуплазмин на латентный период и интенсивность хемилюминесценции (ХЛ) системы гемоглобин-пероксид водорода-люминол. При добавлении сыворотки крови и антиоксидантов к системе наблюдалось увеличение латентного периода и уменьшение интенсивности ее ХЛ. Антиоксиданты в концентрациях, вызывающих снижение амплитуды ХЛ модельной системы на 50%, не изменяли интенсивность фотолюминесценции люминола. Обсуждается возможный механизм действия исследованных антиоксидантов.

Ключевые слова: гемоглобин, пероксид водорода, свободнорадикальное окисление люминола, хемилюминесценция, антиоксиданты сыворотки крови.

Введение. Известно, что свободнорадикальное окисление (СРО) липидов является универсальным механизмом повреждения клетки [1]. Активация этого процесса наблюдается при многих патологических состояниях организма человека [2]. Показано, что в качестве инициаторов СРО липидов *in vitro* и *in vivo* могут выступать активные формы кислорода (АФК), к которым относятся супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) и синглетный кислород (1O_2). При этом OH^{\cdot} рассматривается в качестве наиболее эффективного повреждающего агента [3]. Образование OH^{\cdot} в системах, генерирующих $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , происходит в присутствии ионов металлов переходной валентности, которые находятся в свободном или связанном состоянии. В частности, хорошо изучено участие в этом процессе железа, связанного с ферритином [4], лактоферрином [5] и трансферрином [6].

В отличие от перечисленных выше белков, взаимодействию гемоглобина (Hb) с H_2O_2 уделяется особое внимание, поскольку конкретная схема реакций, протекающих при таком взаимодействии, еще далека от полного понимания. Так, с одной стороны, обнаружено [7], что в результате реакции оксиHb с избытком H_2O_2 происходит быстрое образование метHb. Дегградация метHb в присутствии H_2O_2 сопровождается освобождением свободного железа, взаимодействие которого с H_2O_2 приводит к генерации OH^{\cdot} . [8]. С другой стороны, существуют многочисленные сообщения о том, что взаимодействие оксиHb и метHb с H_2O_2 при определенных условиях протекает через стадию образования феррилHb и/или феррил радикалов Hb [9]. Эти радикалы также характеризуются высокой окисляющей активностью и индуцируют реакции СРО липидов [10]. Последнее особенно важно в связи с тем, что Hb способен генерировать феррил радикалы в присутствии низких концентраций H_2O_2 [7]. Если учесть, что кровь человека содержит высокие уровни Hb и низкие уровни H_2O_2 [11], то их взаимодействие может представлять один из путей образования кислородных радикалов *in vivo*.

Известно, что в норме сыворотка крови человека обладает надежной системой антиоксидантной защиты [12]. Однако, непосредственное взаимодействие составных частей этой защиты с радикалами, возникающими в системе $\text{Hb-H}_2\text{O}_2$, исследовано недостаточно. Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы являлось изучение способности сыворотки крови и отдельных сывороточных антиоксидантов перехватывать радикалы, образующиеся при взаимодействии Hb с H_2O_2 . В качестве молекулы-мишени, подвергающейся СРО в присутствии Hb и H_2O_2 , использовался люминол.

Методика. В работе использовали восстановленный глутатион и человеческий сывороточный альбумин ("Reanal", Венгрия); Hb , мет Hb , каталазу, супероксиддисмутазу, церулоплазмин ("Sigma", США); α -токоферол, урат, трансферрин ("Serva", Германия), люминол ("Merck", Германия). Остальные реактивы были отечественного производства. Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Сыворотку крови получали от здоровых доноров и хранили не более 6 ч при 4°C.

Образование свободных радикалов в системе $\text{Hb-H}_2\text{O}_2$ -люминол изучали с помощью измерения кинетики ее хемилюминесценции (ХЛ), которую регистрировали при 37°C и постоянном перемешивании на хемилюминометре ХЛМ-3 ("Би-кап", Москва). Реакционная среда общим объемом 5,0 мл содержала 0,21 мкМ Hb и 10 мкМ люминола в фосфатном буфере (50 мкМ KH_2PO_4 , 100 мкМ ЭДТА, pH 7,4). Иницирование СРО люминола осуществляли введением H_2O_2 (20 мкМ). Концентрацию H_2O_2 определяли спектрофотометрически, используя $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [13]. В состав буфера добавляли ЭДТА, чтобы исключить разложение H_2O_2 тяжелыми металлами, присутствующими в следовых количествах в воде и химических реактивах.

α -Токоферол растворяли в этаноле. Измерение ХЛ в присутствии α -токоферола проводилось в фосфатном буфере, содержащем 0,02% тритон X-100, конечная концентрация этанола не превышала 0,002% (по объему). Остальные антиоксиданты растворяли в фосфатном буфере.

Спектры флуоресценции люминола (10 мкМ) в фосфатном буфере регистрировали на спектрофлуориметре "Hitachi MPF-4" (Япония). Длина волны возбуждения составляла 355 нм, максимума флуоресценции — 425 нм.

Результаты представлены как средние величины \pm среднеквадратическое отклонение, рассчитанные по данным 3-4 независимых экспериментов.

Результаты и обсуждение. Было обнаружено, что добавление H_2O_2 в реакционную среду, содержащую Hb и люминол, сопровождалось развитием ХЛ (рис. 1, кривая 1). При этом свечение развивалось примерно через 1 мин после введения H_2O_2 (латентный период), достигая максимальных значения на 5-7 минутах и далее постепенно уменьшалось. В отсутствие хотя бы одного из компонентов системы свечение не регистрировалось (рис. 1, кривые 2, 3, 4). Добавление в систему солей двухвалентного (FeSO_4) или трехвалентного (FeCl_3) железа в концентрации 0,84 мкМ, эквивалентной содержанию железа в Hb , также не приводило к возникновению свечения (рис. 1, кривая 5).

Введение в модельную систему сыворотки крови человека приводило к изменению параметров кинетики ее ХЛ (рис. 2): понижению интенсивности свечения (I) и увеличению латентного периода (t). Зависимость интенсивности ХЛ системы $\text{Hb-H}_2\text{O}_2$ -люминол от количества добавляемой сыворотки крови была нелинейной, в то время как латентный период увеличивался практически прямо пропорционально (рис. 3). Такое влияние сыворотки крови на параметры ХЛ модельной

системы может быть обусловлено наличием в ней различных антиоксидантов, способных перехватывать АФК и радикалы люминола.

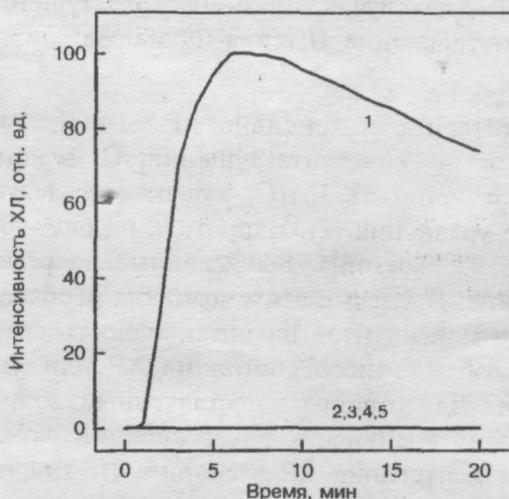


Рис. 1. Кинетики ХЛ модельной системы: 1 — Nb-H₂O₂-люминол; 2 — Nb-люминол; 3 — H₂O₂-люминол; 4 — Nb-H₂O₂; 5 — FeSO₄ или FeCl₃ (0,84 мкМ)-H₂O₂-люминол.

В настоящее время считается, что антиоксидантную защиту сыворотки крови человека от процесса СРО в основном обеспечивают аскорбат, урат, α-токоферол, альбумин, церулоплазмин, трансферрин и SH-группы белков [1, 12]. В связи с этим, было изучено действие всех перечисленных выше антиоксидантов, а также супероксиддисмутазы, каталазы и восстановленного глутатиона на параметры ХЛ системы Nb-H₂O₂-люминол. При этом, супероксиддисмутаза, каталаза и восстановленный глутатион, которые являются главным образом, внутриклеточными антиоксидантами, использовались соответственно в качестве перехватчиков АФК и аналога SH-содержащих сывороточных белков. Обнаружено, что в присутствии исследуемых веществ происходило изменение параметров ХЛ модельной системы, аналогичное их изменению в случае добавления к ней сыворотки крови. В таблице указана концентрация ингибитора, вызывающая уменьшение интенсивности свечения модельной системы на 50% (C_{50%}), относительное увеличение латентного периода (t/t₀), соответствующее этой концентрации, скорость нарастания латентного периода (k) и константа тушения (КТ) интенсивности ХЛ модельной системы для каждого из антиоксидантов. Для исследуемых веществ значение C_{50%} колебалось в пределах от 0,001 мкМ (каталаза) до 11,89 мкМ (трансферрин) и не зависело от природы ингибитора, тогда как увеличение отношения t/t₀ в большей степени было характерно для низкомолекулярных антиоксидантов — α-токоферола, урата, аскорбата и восстановленного глутатиона, чем для белковых — церулоплазмينا, альбумина и трансферрина. На рис. 4а в качестве примера показано изменение t/t₀ от концентрации аскорбата и альбумина. Видно, что зависимость t/t₀ от концентрации антиоксидантов (С) хорошо описывается уравнением

$$t/t_0 = kC + 1 \quad (1).$$

Чем больше значение коэффициента k в линейном уравнении (1), тем большее увеличение латентного периода наблюдается при одинаковой концентрации добавляемых веществ.

Уменьшение интенсивности ХЛ модельной системы в присутствии сывороточных антиоксидантов может определяться, с одной стороны, торможением ими

СРО люминола, а с другой стороны, тушением возбужденного состояния молекулярного продукта этого окисления, в качестве которого рассматривают 3-аминофталат дианион (AP) [14]. Для случая динамического тушения возбужденного состояния AP справедливо уравнение Штерна-Фольмера:

$$I_0/I = 1 + KtC \quad (2),$$

где I_0 и I — соответственно интенсивности ХЛ модельной системы без и в присутствии тушителя; Kt — константа тушения; C — концентрация тушителя. Было установлено, что зависимость $I_0/I(C)$ для всех исследуемых веществ хорошо описывается с помощью уравнения (2). Например, на рис. 4б показаны зависимости $I_0/I(C)$ для аскорбата и альбумина. Вычисленные по результатам эксперимента Kt представлены в таблице. В связи с этим возникла необходимость выяснить, чем обусловлено действие антиоксидантов на интенсивность свечения модельной системы: тушением ими возбужденного состояния AP или их взаимодействием со свободными радикалами? Для ответа на поставленный вопрос было изучено влияние антиоксидантов на интенсивность флуоресценции люминола. При этом учитывалось, что максимум испускания AP в системе Hb-гидроперекись трет-бутилалюминол соответствует 425 нм [15] и совпадает с максимумом испускания люминола. Таким образом, если влияние антиоксидантов на интенсивность свечения системы Hb-H₂O₂-люминол действительно связано с тушением ими возбужденного состояния AP, то аналогичное действие будет наблюдаться на интенсивность флуоресценции люминола. Обнаружено, что все исследованные вещества не влияли на интенсивность флуоресценции люминола в концентрациях, вызывающих снижение интенсивности ХЛ модельной системы на 50%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что уменьшение интенсивности ХЛ системы Hb-H₂O₂-люминол в присутствии антиоксидантов осуществляется не за счет тушения ими возбужденного состояния AP, а за счет их взаимодействия с радикалами, которые возникают в данной модельной системе. Это приводит к уменьшению количества образующегося возбужденного AP, следствием чего будет понижение интенсивности свечения. В этом случае Kt являются константами кажущегося тушения и отражают антиоксидантные свойства исследуемых веществ. Наибольшее значение Kt имела каталаза, поскольку она разлагает исходный инициатор СРО люминола-H₂O₂.

Механизм ингибирующего действия сывороточных антиоксидантов на процесс СРО люминола, индуцированного Hb и H₂O₂, представляется следующим. Увеличение латентного периода ХЛ модельной системы в присутствии низкомолекулярных антиоксидантов: α -токоферола, урата, аскорбата и глутатиона (табл.) — связано, по-видимому, с их взаимодействием с радикалами, инициирующими окисление люминола, а не с разрушением ими H₂O₂, так как добавление каталазы влияния не оказывало на латентный период. В качестве радикалов-инициаторов могут выступать феррил радикалы Hb, которые возникают при взаимодействии H₂O₂ с метHb [9]. Последний всегда присутствует в препаратах Hb или образуется при окислении Hb в метHb [7]. При использовании вместо Hb метHb были получены аналогичные результаты (данные не представлены). Увеличение латентного периода при добавлении перечисленных выше радикальных перехватчиков можно рассматривать как время, необходимое для их разрушения в процессе реакции с феррил радикалами Hb [16].

Влияние антиоксидантов на параметры хемилюминесценции системы Нб-Н₂О₂-люминол

Антиоксидант	C _{50%} , мкМ	t/t ₀	k · 10 ⁶ , М ⁻¹	K _T · 10 ⁶ , М ⁻¹
Церулоплазмин	0,63 (15,5 ЕД/мл)	1,13	0,20	0,92
Альбумин	0,94	1,97	0,73	1,01
α-Токоферол	0,97	4,99	4,32	1,01
Урат	2,69	8,94	3,11	0,37
Аскорбат	2,85	7,12	2,06	0,36
Трансферрин	11,89	2,46	0,12	0,09
Супероксиддисмутаза	5,82 (384 ЕД/мл)	1,54	0,09	0,18
Каталаза	0,001 (0,52 ЕД/мл)	1,00	0,18	1288
Глутатион восстановленный	3,42	9,22	2,52	0,31

Примечание. В скобках указана соответствующая активность ферментов в системе. Среднеквадратическое отклонение каждого из параметров не превышало 10%.

Помимо феррил радикалов Нб, в иницировании СРО люминола в данной системе не исключено также участие ОН. Известно, что взаимодействие Нб с Н₂О₂ может сопровождаться освобождением железа из гема, которое частично находится в восстановленной форме (Fe²⁺) [8]. И хотя в настоящей работе регистрацию ХЛ проводили в присутствии 100 мкМ ЭДТА, образующей хелатные комплексы с двухвалентным и трехвалентным железом, последнее остается активным в составе комплекса и способно катализировать реакцию разрушения Н₂О₂ с образованием ОН· (реакция Фентона) [17]. Однако, указанный путь не является, по-видимому, ведущим в иницировании окисления люминола, поскольку добавление в реакционную среду ионов Fe²⁺ и Fe³⁺ не приводило к развитию ХЛ, наблюдаемой в случае использования Нб (рис. 1). Это, с одной стороны, подтверждает необходимость наличия гемовой структуры и глобиновых цепей для образования радикалов-инициаторов [9, 16], с другой стороны, объясняет невысокий, по сравнению с остальными ингибиторами, антиоксидантный эффект такого хелатора ионов Fe³⁺, как трансферрин.

В отличие от низкомолекулярных антиоксидантов, белковые антиоксиданты сыворотки крови — церулоплазмин и альбумин — в меньшей степени влияли на латентный период. В связи с этим можно предположить, что они взаимодействуют не столько с радикалами-инициаторами, сколько с радикалами и АФК, образующимися при окислении люминола. В качестве одного из них следует назвать О₂⁻, который является промежуточным продуктом в реакциях СРО люминола [14]. Действительно, добавление супероксиддисмутазы в модельную систему вызывало уменьшение интенсивности ее ХЛ без существенного увеличения латентного периода (табл.). Подобный механизм антирадикального действия нельзя исключить для церулоплазмينا, обладающего О₂⁻-перехватывающей способностью [18].

Таким образом, сыворотка крови и исследованные сывороточные антиоксиданты обладали способностью ингибировать окисление люминола, индуцированное с помощью Нб и Н₂О₂. Механизм ингибирования связан с перехватом радикалов, образующихся в данной модельной системе. Полученные результаты могут быть использованы при создании теста определения антиокислительной активности сыворотки крови и других биологических жидкостей.

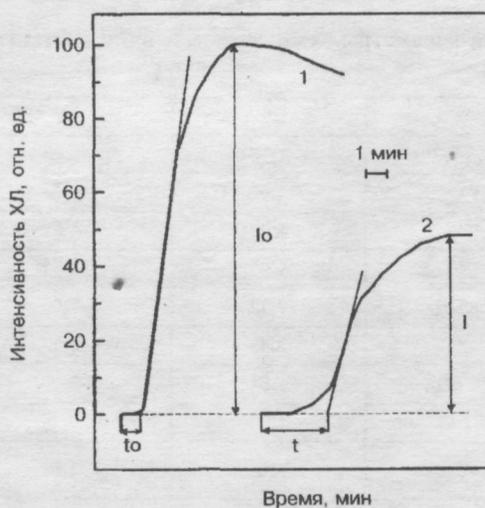


Рис. 2. Кинетики ХЛ системы Нб-Н₂О₂-люминол без (1) и в присутствии 4 мкл сыворотки крови (2). I₀, I — интенсивности ХЛ; t₀, t — латентные периоды без и в присутствии сыворотки крови соответственно.

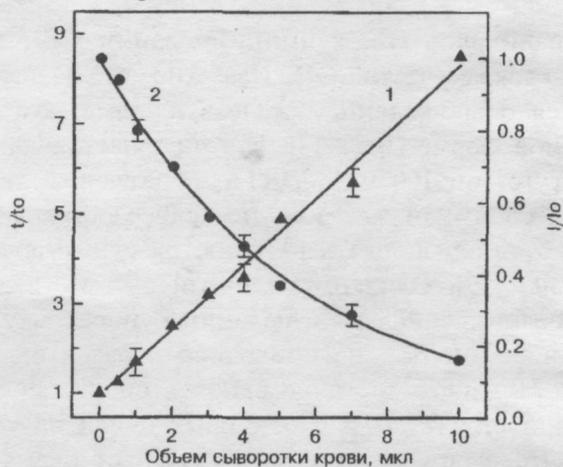


Рис. 3. Влияние сыворотки крови на латентный период (1) и интенсивность ХЛ (2) системы Нб-Н₂О₂-люминол. По оси ординат слева — латентный период по отношению к контролю (t/t₀), по оси ординат справа — интенсивность ХЛ по отношению к контролю (I/I₀).

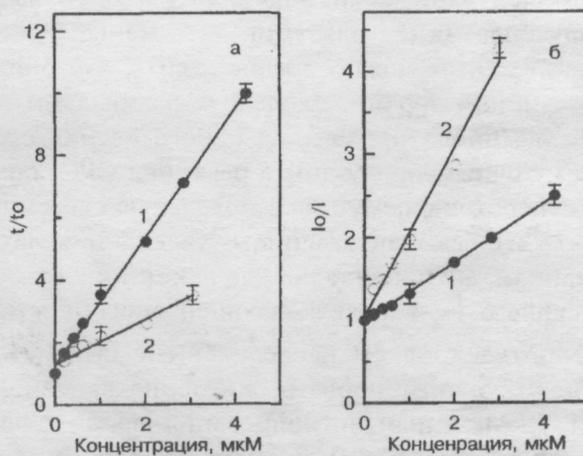


Рис. 4. Влияние аскорбата (1) и альбумина (2) на латентный период (а) и интенсивность ХЛ (б) системы Нб-Н₂О₂-люминол. t₀, t — латентные периоды; I₀, I — интенсивности ХЛ без и в присутствии антиоксидантов соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др.* Свободные радикалы в живых системах: Биофизика: Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. — М., 1991. — Т. 29. — С. 1-252.
- 2 *Vladimirov Y.A.* // Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases. — New York, London: Alan R. Liss Inc., 1986. — P. 141-195.
- 3 *Halliwell B.* // Amer. J. Med. — 1991. — V. 91, Suppl. 3C. — P. 14-22.
- 4 *O'Connell M.J., Peters T.J.* // Chem. and Phys. Lipids. — 1987. — V. 45, N 2-4. — P. 241-249.
- 5 *Bannister J.V., Bannister W.H., Hill H.A.O., Thornalley P.J.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — V. 715, N 1. — P. 116-120.
- 6 *Motohashi N., Mori I.* // FEBS Lett. — 1983. — V. 157, N 1. — P. 197-199.
- 7 *Purpo A., Halliwell B.* // Biochem. J. — 1988. — V. 249, N 1. — P. 185-190.
- 8 *Якутова Э.Ш., Осипов А.Н., Костенко О.В. и др.* // Биофизика. — 1992. — Т. 37, N 6. — С. 1021-1028.
- 9 *Nohl H., Stolze K.* // Free Radic. Biol. Med. — 1993. — V. 15, N 3. — P. 257-263.
- 10 *Yamana T., Volkmer C., Grishan M.B.* // Free Radic. Biol. Med. — 1991. — V. 10, N 1. — P. 41-49.
- 11 *Yamamoto Y., Ames B.N.* // Free Radic. Biol. Med. — 1987. — V. 3, N 5. — P. 359-361.
- 12 *Frei B., Stocker R., Ames B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1988. — V. 85, N 24. — P. 9748-9752.
- 13 *Bergmeyer H.U., Gawehn K., Grassi M.* // Methoden der Enzymatischen Analyse / Ed. Bergmeyer H.U. — Verlag Chemie, Weinheim, 1970. — V. 1. — P. 440.
- 14 *Faulkner K., Fridovich I.* // Free Radic. Biol. Med. — 1993. — V. 15, N 4. — P. 447-451.
- 15 *Iwaoka T., Tobata F., Takahashi T.* // Free Radic. Biol. Med. — 1987. — V. 3, N 5. — P. 329-333.
- 16 *Lissi E.A., Escobar J., Pascual C. et al.* // Photochem. and Photobiol. — 1994. — V. 60, N 5. — P. 405-411.
- 17 *Gutteridge J.M.C.* // Chem.-Biol. Interactions. — 1985. — V. 56, N 1. — P. 113-120.
- 18 *Шаронов Б.П., Говорова Н.Ю., Лызлова С.Н.* // Биохимия. — 1988. — Т. 53, N 5. — С. 816-825.

INHIBITION BY SERUM ANTIOXIDANTS OF LUMINOL OXIDATION IN THE PRESENCE OF HEMOGLOBIN AND HYDROGEN PEROXIDE

Yu. O. Teselkin, I. V. Babenkova, O. B. Lyubitsky, G. I. Klebanov, Yu. A. Vladimirov

Department of Biophysics, Russian State Medical University, Ostrovityanova ul., 1, Moscow, 117869, Russia

The effect of human blood serum and several serum antioxidants (ascorbate, α -tocopherol, urate, albumin, transferrin and ceruloplasmin) on latent period and chemiluminescence (CL) intensity of hemoglobin-hydrogen peroxide-luminol system has been investigated. The addition of blood serum and antioxidants to the system increased the latent period and decreased CL intensity. The antioxidants had been taken in concentrations caused 50% inhibition of CL intensity of model system had not effected on the luminol photoluminescence. The possible mechanism of action of the antioxidants is discussed.

Key words: hemoglobin, Hydrogen peroxide, luminol free radical oxidation, chemiluminescence, blood serum antioxidants.