

**МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ
СИСТЕМЫ ГЕМОГЛОБИН/ГИДРОПЕРОКСИД
ФОСФАТИДИЛХОЛИНА/КУМАРИН 334**

Камионская М. В.

*студентка V курса химического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
г. Москва, Россия
mari-kam@mail.ru;*

Созарукова М. М.

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза
функциональных материалов и переработки минерального сырья
Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова
Российской академии наук, г. Москва, Россия
s_madinam@bk.ru;*

Проскурнина Е. В.

д.м.н.,

*доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии
Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, г.
Москва, Россия
proskurnina@gmail.com;*

Фосфолипиды являются важными субстратами свободнорадикальных реакций, в том числе с участием главного прооксиданта крови — гемоглобина. Целью данной работы был анализ кинетики перекисного окисления гидропероксида фосфатидилхолина, катализируемого дезоксигемоглобином, в присутствии кумарина 334 хемилюминесцентным методом с математическим моделированием экспериментальных кривых. Получено, что гемоглобин по отношению к субстрату проявляет фосфолипипероксидазоподобную активность. Предложена схема из 4-х реакций, наиболее удовлетворительно описывающая кинетику системы, и подобраны константы скоростей, характеризующих прооксидантную активность гемоглобина.

***Ключевые слова:** свободные радикалы; хемилюминесценция; гемоглобин; перекисное окисление фосфолипидов; механизм; кинетика реакции; скорость реакции; моделирование*

**COMPUTER SIMULATION OF THE KINETICS OF THE
CHEMILUMINESCENT SYSTEM OF
HEMOGLOBIN/PHOSPHATIDYLCHOLINE
HYDROPEROXIDE/COUMARIN 334**

Kamionskaya M. V.

*5th year student of the Faculty of Chemistry
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

mari-kam@mail.ru;

Sozarukova M. M.

*Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory for the
advanced materials synthesis and minerals processing
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia*

s_madinam@bk.ru;

Proskurnina E. V.

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of
Molecular Biology*

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

proskurnina@gmail.com;

Phospholipids are important substrates of free-radical reactions, including those involving the main blood prooxidant, hemoglobin. The aim of this work was to analyze the kinetics of phosphatidylcholine hydroperoxidation catalyzed by deoxyhemoglobin in the presence of coumarin 334 by chemiluminescent method with computer simulation of experimental curves. It was obtained that hemoglobin exhibits phospholipoperoxidase-like activity towards to the substrate. The scheme of 4 reactions, most satisfactorily describing the kinetics of the system, was proposed and the rate constants characterizing the pro-oxidant activity of hemoglobin were selected.

Key words: *free radicals; chemiluminescence; hemoglobin; phospholipid peroxidation; mechanism; reaction kinetics; reaction rate; computer simulation*

В развитии ряда социально значимых заболеваний особое место занимает окислительный стресс, в одних случаях являясь первичным звеном патогенеза, в других — следствием [1]. В организме существуют различные мишени действия свободных радикалов. Наиболее чувствительными к свободнорадикальному окислению являются липиды («*primary target*») и фосфолипиды [2, 3]. Важную роль в процессах липидной пероксидации играет Fe (II). Безусловно, в организме главным источником ионов железа является основной белок эритроцитов — гемоглобин. Процесс липидной пероксидации изучен довольно подробно [2], в свою очередь перекисное окисление фосфолипидов (ПОФЛ) требует систематического анализа механизмов и поиска высокоэффективных антиоксидантов для ингибирования ПОФЛ.

Таким образом, целью работы был анализ кинетики перекисного окисления гидропероксида фосфатидилхолина, катализируемого гемоглобином, в присутствии кумарина 334 хемилюминесцентным методом с математическим моделированием экспериментальных кривых.

Материалы и методы.

Хемилюминесцентная методика регистрации кинетики перекисного окисления фосфолипидов. Хемилюминесценцию (ХЛ) регистрировали на одноканальном хемилюминометре Lum-100 (ДИСофт, Россия) при комнатной температуре. В пластиковой кювете смешивали аликвоты гидропероксида

фосфатидилхолина (PCOON, препарат «Фосфолипovit», ИБМХ), кумарина 334 (Cum 334) — ХЛ-зонд, чувствительный к липидным и фосфолипидным радикалам, и необходимое количество фосфатного буферного раствора (ФБР, 100 мМ рН 7.4). Общий объем составлял 1.000 мл. Регистрировали спонтанную ХЛ в течение 30–60 с. Реакцию перекисного окисления фосфолипида инициировали добавлением к системе дезоксигемоглобина (Hb) (стабилизация гепарином лития 17 МЕ/мл).

Математическое моделирование хемилюминесцентных кривых. Моделирование кинетики экспериментальных кривых проводили при помощи программы Kinetic Analyzer (разработчик Д.Ю. Измайлов). В данной программе решается прямая задача, а именно предполагается построение математической модели, представляющей собой набор химических реакций, и вычисление значений констант скоростей этих реакций, при которых совпадение теоретической и экспериментальной кривых будет удовлетворительным.

Результаты и обсуждение. Хемилюминесцентные кривые (ХЛ-кривые), полученные при варьировании концентраций компонентов системы, фосфолипида, дезоксигемоглобина и кумарина 334, приведены на рис. 1(а) – (в), соответственно.

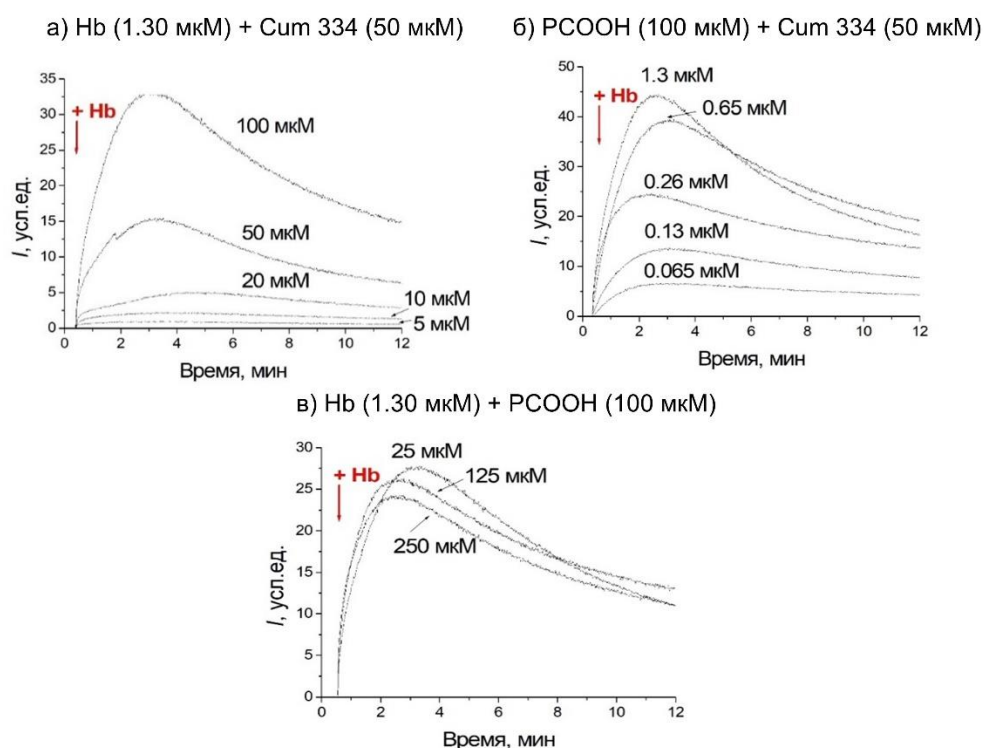
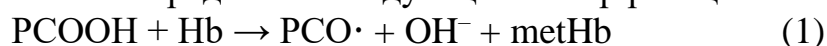


Рисунок 1. ХЛ–кривые при разных концентрациях (а) PCOON; (б) Hb; (в) Cum 334.

Система характеризовалась высокой интенсивностью свечения, наблюдалась экспоненциально затухающая кинетика, развивающаяся относительно медленно при сравнении с кривыми по типу быстрой вспышки в случае липидной перекисидации [2]. Увеличение концентраций PCOON и Hb приводило к дозозависимому эффекту усиления ХЛ. В свою очередь

варьирование содержания в системе кумарина 334 не вызывало существенного изменения аналитического сигнала. Незначительное снижение интенсивности ХЛ можно объяснить эффектом перепоглощения.

С целью подбора наиболее вероятной схемы реакций и констант скоростей взаимодействия гемоглобина с субстратом восстановления было проведено математическое моделирование экспериментальных кривых. На основании литературных данных [4] возможными продуктами взаимодействия субстрата (гидропероксид фосфолипида) с катализатором (гемоглобином) могут быть радикалы фосфолипида ($\text{PCO}\cdot$) и окисленная форма гемоглобина (метгемоглобин, metHb). Как известно, кумарин 334 является, так называемым, физическим активатором (рис. 1в), в основе действия которого процесс переноса (миграции) энергии с молекулы продукта ХЛ-реакции на активатор [5]. Следующим предположением при построении математической модели был тот факт, что два радикала фосфолипида при взаимодействии друг с другом образуют некий промежуточный продукт в возбужденном состоянии (P^*). В дальнейшем переход продукта в основное состояние (P) сопровождается высвобождением квантов света ($h\nu$). В связи с выше сказанным, для описания кинетики был предложен следующий набор реакций:



Взяв за основу предложенную схему реакций (1) – (4) с соответствующими начальными концентрациями компонентов системы $\text{Hb}/\text{PCOON}/\text{Cum}$ 334, осуществляли подбор констант реакций до совпадения расчетных и экспериментальных кривых. Результаты моделирования экспериментальных кривых при варьировании концентраций гидропероксида фосфатидилхолина и дезоксигемоглобина приведены на рис. 2(а) и (б), соответственно:

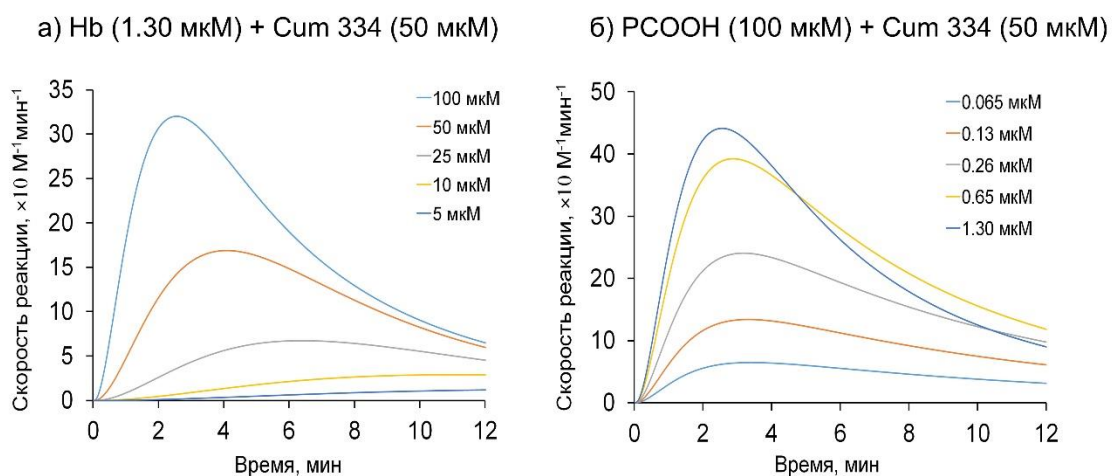


Рисунок 2. Данные моделирования кинетики ХЛ-системы $\text{Hb}/\text{PCOON}/\text{Cum}$ 334 при изменении концентраций: (а) PCOON; (б) Hb.

Наилучшее соответствие между экспериментальными и рассчитанными ХЛ-кривыми было найдено при следующих значениях констант ($M^{-1}min^{-1}$):

$$k_1 = 9.00 \times 10^3,$$

$$k_2 = 9.00 \times 10^2,$$

$$k_3 = 4.00 \times 10^4,$$

$$k_4 = 8.00 \times 10^2,$$

полученные константы являются количественной характеристикой прооксидантной активности гемоглобина, отражая скорость его взаимодействия с субстратом восстановления.

Заключение. Получены кинетические кривые в ХЛ-системе Нь/PCOON/Cum 334 при варьировании концентраций всех компонентов. Данные хемилюминесцентного анализа демонстрируют прооксидантные свойства дезоксигемоглобина по отношению к гидропероксиду фосфатидилхолина в присутствии кумарина 334.

Методом математического моделирования кинетики предложен возможный механизм (реакции (1) – (4)) процессов, протекающих при перекисном окислении гидропероксида фосфатидилхолина, катализируемом дезоксигемоглобином. Подобраны константы скоростей реакций, являющиеся количественной характеристикой прооксидантной активности дезоксигемоглобина.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-2763.2021.1.3).

Список литературы.

1. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine / H. Sies // *Redox Biol.* — 2015. — 4. — P. 180–183.
2. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 102 с.
3. Reis, A. Chemistry of phospholipid oxidation / A. Reisand, C. M. Spickett, // *BBA. Biomembranes.* — 2012. — 1818(10). — P. 2374–2387.
4. Antunes, F. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model / F. Antunes, A. Salvador, H. S. Marinho, R. Alves, R. E. Pinto // *Free Radic. Biol. Med.* — 1996. — V. 21(7). — P. 917–943.
5. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биол. химии.* — 2009. — Т. 49. — №. 7. — С. 341–388.