

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ ТИОЛОВ

**Пойменова Ю. А.**

*студентка V курса химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова,  
Москва, Россия  
poymenovajul@gmail.com;*

**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, 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,  
Москва, Россия  
proskurnina@gmail.com;*

*Наиболее чувствительными к действию свободнорадикального окисления являются тиолсодержащие соединения — одни из ключевых участников многокомпонентной антиоксидантной системы. Целью работы был анализ кинетики свободнорадикального окисления тиолов в присутствии люминола хемиллюминесцентным методом с математическим моделированием экспериментальных кривых. Зарегистрированы кинетические кривые для модельных тиолов в системе генерации алкилпероксильных радикалов, включающие латентный период (фаза 1) и прирост хемиллюминесценции относительно контрольного уровня свечения (фаза 2). В качестве возможного механизма предложена схема из 4-х реакций, удовлетворительно описывающая кинетику фазы 1, и подобраны константы скоростей, являющиеся количественной мерой антиоксидантной активности тиолов.*

**Ключевые слова:** *окислительный стресс; свободные радикалы; тиолы; антиоксидантная активность; хемиллюминесценция; механизм; кинетика реакций, скорость реакции; математическое моделирование*

## COMPUTER SIMULATION THE KINETICS OF FREE-RADICAL REACTIONS INVOLVING THIOLS

**Poymenova Yu. A.**

*5th year student of the Faculty of Chemistry  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
poymenovajul@gmail.com;*

**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;*

*Thiol-containing compounds, one of the key members of the multicomponent antioxidant system, are the most sensitive to the action of free-radical oxidation. The aim of the work was to analyze the kinetics of free radical oxidation of thiols in the presence of luminol by chemiluminescent method with mathematical modeling of experimental curves. Kinetic curves for model thiols in the system of alkylperoxyl radicals generation were recorded, including the latent period (phase 1) and chemiluminescence enhancement versus control (phase 2). A scheme of 4 reactions, satisfactorily describing phase 1 kinetics, was proposed as a possible mechanism, and rate constants, which are a quantitative measure of thiols antioxidant activity, were selected.*

**Key words:** *oxidative stress; free radicals; thiols; antioxidant activity; chemiluminescence; mechanism; reaction kinetics; reaction rate; computer simulation*

В организме человека постоянно образуется определенное количество свободных радикалов, необходимых для обеспечения нормальной жизнедеятельности. Однако их избыточная продукция приводит к развитию окислительного стресса. Действию свободнорадикального окисления противостоит многокомпонентная антиоксидантная система. Одними из ключевых участников антиоксидантного звена являются сывороточный альбумин и система глутатиона [1]. Все большее значение приобретает поиск специфических биомаркеров и разработка методик оценки тиолового окислительного стресса. Таким образом, целью данной работы был анализ кинетики свободнорадикального окисления тиолов в присутствии люминола хемилюминесцентным методом с последующим математическим моделированием экспериментальных кривых.

#### **Материалы и методы.**

**Анализ антиоксидантных свойств модельных тиолов.** Антиоксидантную активность образцов (глутатион, L-гомоцистеин, L-цистеин) исследовали в молекулярной модели генерации органических радикалов в присутствии люминола хемилюминесцентным методом. В качестве источника свободных радикалов использовали 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП) [2]. Хемилюминесценцию (ХЛ) регистрировали с помощью прибора Lum-1200 (ДИСофт, Россия). Образование

алкилпероксильных радикалов инициировали добавлением смеси АБАП ( $c = 2.5$  мкМ) с люминолом ( $c = 2.0$  мкМ) к предварительно нагретому до  $37^\circ\text{C}$  фосфатному буферному раствору. После выхода экспериментальной кривой на плато в систему вносили аликвоту исследуемого образца. Общий объем системы составлял 1.000 мл.

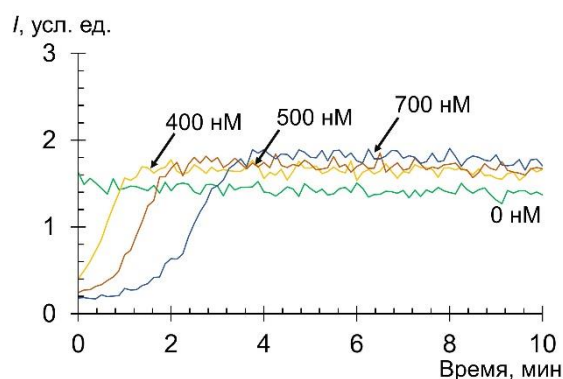
**Математическое моделирование хемилюминесцентных кривых.** Моделирование кинетики экспериментальных кривых проводили при помощи программы Kinetic Analyzer (разработчик Д.Ю. Измайлов). В данной программе решается прямая задача, а именно предполагается построение математической модели, представляющей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

### Результаты и обсуждение.

**Анализ кинетики ХЛ-системы АБАП/Люминол/глутатион.** Типичный вид ХЛ-кривых для глутатиона приведен на рис. 1. Как видно, кинетическая кривая состоит из двух фаз. Первая фаза (фаза 1) представляет собой латентный период (область подавления ХЛ), вторая (фаза 2) — отражает прирост интенсивности свечения ( $I$ ) относительно контрольного уровня ( $I_0$ ). С ростом концентрации GSH происходит дозозависимое увеличение латентного периода и  $\Delta I = I - I_0$ . Наиболее выраженный эффект наблюдали для латентного периода. На основании литературных данных [1, 3] в качестве наиболее вероятной схемы реакции была предложена следующая упрощенная модель:

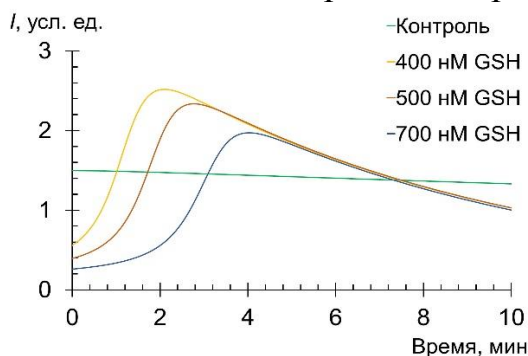
- (1)  $\text{АБАП} \rightarrow 2\text{R}_1\bullet$ ,
- (2)  $\text{R}_1\bullet + \text{Люм} \rightarrow \text{Люм}\bullet$ ,
- (3)  $\text{Люм}\bullet \rightarrow \text{P} + h\nu$  (ХЛ-реакция),
- (4)  $\text{R}_2\text{SH} + \text{R}_1\bullet \rightarrow \text{R}_2\text{S}\bullet \rightarrow \text{продукт окисления}$ ,

где уравнение (1) соответствует термоиндуцированному распаду АБАП с образованием алкилпероксильных радикалов ( $\text{R}_1\bullet$ ), уравнение (2) — образованию радикалов люминола ( $\text{Люм}\bullet$ ), в результате реакции (3) продукт люминола переходит из возбужденного состояния в основное с высвобождением  $h\nu$  (ХЛ-реакция), реакция (4) отражает свободнорадикальное окисление глутатиона ( $\text{R}_2\text{S}\bullet$  является одним из продуктов окисления). Предложенная схема реакций позволила удовлетворительно смоделировать изменение латентного периода. На основании этого, можно сделать вывод о том, что за формирование фазы 2 отвечает набор реакций, отличный от предложенного. Найденные значения констант скоростей были равны:  $k_1 = 9,05 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,



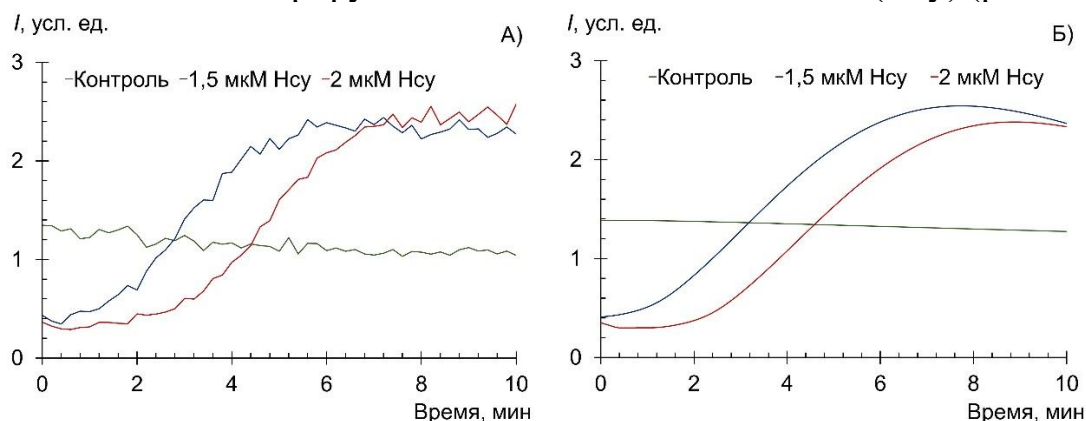
**Рисунок 1. Экспериментальные кривые системы АБАП/Люм/GSH.**

$k_2 = 2,60 \times 10^{-5} \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_3 = 3,00 \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_4 = 1,20 \times 10^2 \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ . Кривые, полученные методом математического моделирования, представлены на рис. 2.



**Рисунок 2.** Кинетические кривые системы АБАП/Люм/GSH, полученные при моделировании.

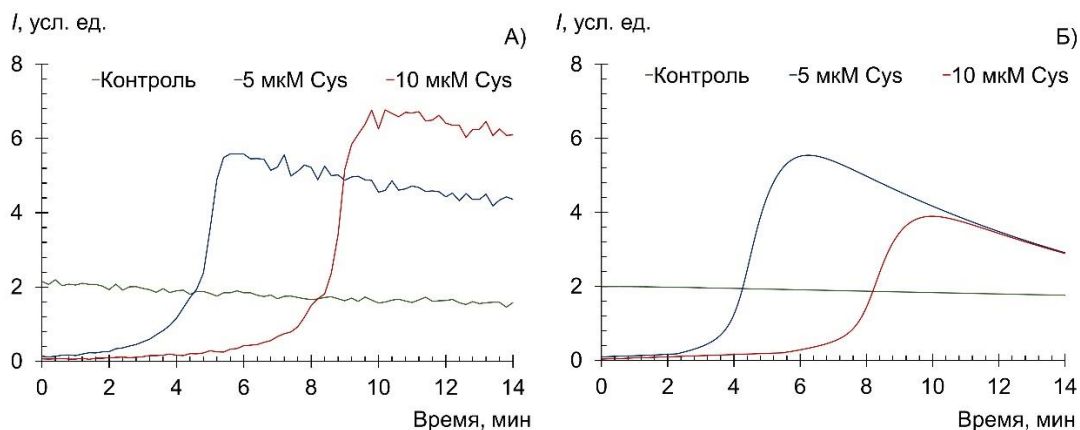
Далее были получены экспериментальные и модельные кривые при добавлении к АФК-генерирующей системе L-гомоцистеина (Hcy) (рис. 3А, Б).



**Рисунок 3.** Экспериментальная (А) и рассчитанная (Б) кинетики системы АБАП/Люм/Hcy.

Вид кинетических кривых (фаза 1) гомоцистеина схож с аналогичными для глутатиона, что позволило предположить одинаковые механизмы свободнорадикальных процессов и смоделировать кинетику по предложенной ранее схеме. Однако из-за существенных количественных различий в антиоксидантной емкости исследуемых тиолов для характеристики антиоксидантной активности Hcy были подобраны следующие константы:  $k_1 = 9,90 \times 10^{-3} \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_2 = 1,50 \times 10^{-3} \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_3 = 2,00 \times 10^{-1} \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_4 = 4,90 \times 10^1 \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ .

Аналогично были зарегистрированы и смоделированы кинетические кривые для L-цистеина (Cys), рис. 4А, Б.



**Рисунок 4.** Экспериментальная (А) и рассчитанная (Б) кинетики системы АБАП/Люм/Сус.

Как и для ранее исследованных тиолов, наблюдали дозозависимое изменение латентного периода с увеличением концентрации Сус. Моделирование проводили по предложенной ранее схеме. Были найдены следующие значения констант скоростей:  $k_1 = 1,00 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_2 = 9,00 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_3 = 9,00 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_4 = 4,0 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ .

#### **Заключение.**

Зарегистрирована кинетика свободнорадикального окисления модельных тиолов, глутатиона, L-гомоцистеина и L-цистеина, в ХЛ-системе АБАП/люминол. Установлено, что экспериментальные кривые включают две фазы: латентный период (фаза 1) и прирост ХЛ ( $\Delta I$ ) относительно контрольного уровня свечения (фаза 2). В результате математического моделирования предложен возможный механизм (реакции (1) – (4)) процессов, протекающих в системе АБАП/Люм/тиол. Предложенная модель позволяет удовлетворительно описать кинетику фазы 1 (латентный период) на ХЛ-кривых. Найдены значения констант скоростей для свободнорадикальных реакций с участием тиолов, являющиеся количественной мерой их антиоксидантной активности.

#### **Список литературы**

1. Turell, L. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes / L. Turell, R. Radi, B. Alvarez // *Free Radic. Biol. Med.* — 2013. — V. 65. — P. 244–253.
2. Алексеев, А. В. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2, 2'-азо-бис (2-амидинопропана) / А. В. Алексеев, Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров // *Вестник Московского ун-та, сер.: Химия.* — 2012. — Т. 53, №. 3. — С. 187–193.
3. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биол. химии.* — 2009. — Т. 49, №. 7. — С. 341–388.