

УДК 576.32/36:535.379

Хемилюминесценция в исследовании свободнорадикальных реакций.

Часть 2. Люминесцирующие добавки для увеличения квантового выхода хемилюминесценции

Л. А. Ромодин*

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, 123098 Россия

*E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020

Принята к печати 11.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11427

РЕФЕРАТ В настоящем обзоре рассмотрено применение метода регистрации хемилюминесценции, усиленной специальными люминофорами, для оценки течения свободнорадикальных процессов в модельных биологических системах. Проанализировано применение метода при использовании люминесцирующих добавок, усиливающих свечение за счет триплет-синглетного переноса энергии электронного возбуждения с продуктов радикальных реакций с последующим ее испусканием с высоким квантовым выходом в виде света и называемых активаторами, или усилителями хемилюминесценции. Приведены примеры этих веществ, описаны различия между так называемыми химическими и физическими усилителями, подробно рассмотрены производные кумарина как усилители хемилюминесценции, наиболее перспективные для изучения перекисного окисления липидов. Обозначены главные проблемы, связанные с использованием производных кумарина, и возможные пути решения этих проблем. Собственная хемилюминесценция и механизм возникновения свечения, сопровождающего реакции перекисаации биомолекул, были рассмотрены в первой части обзора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА свободнорадикальные реакции, апоптоз, ферроптоз, хемилюминесценция, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, усилители хемилюминесценции, производные кумарина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DTMC – 7-(4,6-дихлор-1,3,5-триазирил-2-амино)-4-метилкумарин; C-314 – кумарин-314 – хинолизидин[5,6,7-gh]3-этоксикарбонилкумарин; C-334 – кумарин-334 – хинолизидин[5,6,7-gh]3-ацетилкумарин; C-525 – кумарин-525 – хинолизидин[5,6,7-gh]3,2'-бензимидазолилкумарин; ЭВС – электронные возбужденные состояния.

ВВЕДЕНИЕ

В силу крайне низкой интенсивности собственной хемилюминесценции, механизмы возникновения которой описаны в первой части обзора [1], ее регистрация крайне сложна. К тому же зачастую необходимо исследовать реакции с образованием и участием конкретных радикалов, к примеру, реакции перекисаации липидов, т.е. оценить наличие в исследуемой системе именно липидных радикалов, но метод регистрации собственной хемилюминесценции неспецифичен.

Для увеличения интенсивности хемилюминесценции применяют вещества, внесение которых в систему увеличивает интенсивность хемилюминесценции. Эти вещества называют активаторами хемилюминесценции (chemiluminescence enhancers, или activators). Определенную группу этих веществ

называют хемилюминесцентными зондами, однако и этот термин зачастую используется бессистемно. С химической точки зрения наиболее верными терминами были бы «хемилюминесцентный реагент», или «люминесцентная добавка». Неудачность термина «активатор» обусловлена тем, что в широком смысле этот термин трактуется как проявление способности того или иного соединения к химическим взаимодействиям, а в узком – как действующая часть концентрации. В монографии [2] приведен небольшой список терминов, относящихся к теме хемилюминесценции. В этом списке представлен термин «инициатор», под которым понимается «химически активное вещество, создающее первичные активные центры и тем увеличивающее скорость реакции, поставляющей активные продукты и изменяющей квантовый выход возбуждения». Под это

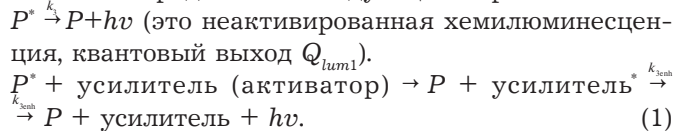
определение может подойти и термин «активатор». Отметим, что в биологических системах люминесцирующие добавки находятся в водной среде с рН около 7, где они могут иметь слабую растворимость, что ведет к агрегации. А взаимодействие фагоцитов с микрочастицами добавки активирует выработку активных форм кислорода [3, 4], поэтому термин «активатор» можно применить в данной системе по отношению к обсуждаемым добавкам.

Термин «активатор» допустимо использовать при описании систем с химически инициированной электронно-обменной люминесценцией, например, хемилюминесценцией эфиров оксалата [5]. В этом случае введение в систему флуорофора с низким потенциалом ионизации приводит к переносу электрона с этого соединения на интермедиат с последующим обратным переносом электрона, приводящим к возбуждению флуорофора, становящегося эмиттером хемилюминесценции. Однако чаще всего для обозначения люминесцирующей добавки используют именно термин «активатор», определяя это вещество как соединение, имеющее высокий квантовый выход излучения и усиливающее свечение за счет физической миграции энергии электронных возбужденных состояний (ЭВС), не изменяя квантовых выходов возбуждения продуктов радикальной реакции и ее скорость [2, 6, 7].

Усиление свечения в присутствии указанных веществ происходит в результате миграции энергии электронного возбуждения с продуктов реакции на добавку, которая (или продукт взаимодействия которой с продуктом радикальной реакции – донором возбуждения) является более эффективным эмиттером света, чем возбужденное вещество-донор. В 1963 году Р.Ф. Васильев исследовал механизм усиления хемилюминесценции при добавлении к находящимся в триплетном ЭВС кетоновым продуктам свободнорадикального окисления углеводородных субстратов производных антрацена [8]. Образующиеся возбужденные молекулы производных антрацена находились не в триплетном, а в синглетном ЭВС. Таким образом, был детально изучен процесс физического усиления хемилюминесценции в результате триплет-синглетного переноса энергии в жидкой фазе – фундаментальный фотофизический процесс, который широко используется для усиления свечения в хемилюминесцентных системах [8]. Заметим, что усиление хемилюминесценции в присутствии производных антрацена показано на год раньше [9], однако механизм этого усиления не был изучен. Анализ действия антрацена и его производных показал, что сам антрацен менее эффективен, нежели его галогензамещенные производные, особенно 9,10-дибромантрацен [9–11].

Рассчитанный для него «коэффициент запрета» триплет-синглетного перехода, равный отношению константы скорости этого процесса к константе скорости диффузии, составляет 10^{-2} [11].

Процесс усиления хемилюминесценции схематично можно представить следующим образом:



Это активированная хемилюминесценция, квантовый выход Q_{lum2} . При этом $Q_{lum1} \ll Q_{lum2}$.

Важной характеристикой усилителя хемилюминесценции является не только значение квантового выхода хемилюминесценции, но и его произведение на коэффициент молярной экстинкции данного вещества, так как именно это произведение прямо пропорционально яркости свечения [12].

Р.Ф. Васильев и В.Я. Беляков заложили основы использования триплет-триплетного и триплет-синглетного переноса энергии ЭВС для количественного исследования процессов хемилюминесценции [11]. В частности, раскрыта взаимосвязь между скоростями процессов миграции электронного возбуждения с продукта радикальной реакции – донора электронного возбуждения, концентрацией акцептора (обозначим ее буквой А) электронного возбуждения – усилителя хемилюминесценции, и интенсивностью хемилюминесценции в отсутствие акцептора возбуждения J_0 и в его присутствии J :

$$\frac{1}{\frac{J}{J_0} - 1} = \frac{1}{\frac{Q_{LumEnh} \cdot k_{TS}}{Q_{LumPr} \cdot (k_{TT} + k_{TS})} - 1} + \frac{1}{\frac{Q_{LumEnh} \cdot k_{TS}}{Q_{LumPr} \cdot (k_{TT} + k_{TS})} - 1} \cdot \frac{1}{(k_{TT} + k_{TS}) \cdot t_{ps} \cdot A}, \quad (2)$$

где Q_{LumEnh} – квантовый выход люминесценции усилителя – акцептора электронного возбуждения, Q_{LumPr} – квантовый выход возбужденного продукта радикальной реакции – донора электронного возбуждения, t_{ps} – среднее время жизни возбуждения донора в отсутствие акцептора, k_{TT} – константа скорости триплет-триплетного переноса энергии – тушения хемилюминесценции, k_{TS} – константа скорости триплет-синглетного переноса электронного возбуждения на молекулу акцептора. Константа скорости триплет-триплетного переноса, не ведущего к последующей люминесценции, выше, чем триплет-синглетного [11]. При разложении 1,2-диоксетанона неэмиссионный триплет-триплетный переход энергии присутствует в большей степени в сравнении с 1,2-диоксетаном, что определяет более низкую эф-

фективность эмиссии активированного разложения диоксетанона по сравнению с диоксетаном [13].

Однако разные усилители хемилюминесценции имеют разные механизмы перехвата ЭВС у продуктов радикальных реакций. Имеются две группы усилителей хемилюминесценции. При этом необходимо указать на ряд проблем в их терминологии. Люминесцирующие добавки первой группы химически реагируют с участниками или продуктами свободнорадикальной реакции, переходя при этом в ЭВС, квантовый выход которого гораздо выше, нежели у собственной хемилюминесценции. По терминологии, предложенной А.И. Журавлевым [2], эти вещества названы «хемилюминесцентными зондами». Ю.А. Владимиров эти вещества называет также «химическими активаторами» хемилюминесценции [6]. С точки зрения химии, этим веществам больше подошел бы термин «хемилюминесцирующий реагент», так как они лишь заменяют реакционные маршруты активных форм кислорода, которые в естественных условиях ведут к сверхслабой хемилюминесценции, на другие пути, которые приводят к более сильной хемилюминесценции. Вещества из второй группы люминесцирующих добавок перехватывают ЭВС без химического взаимодействия с компонентами системы. Представители научной школы Ю.А. Владимирова [6, 14–16] называют эти вещества физическими активаторами хемилюминесценции, распространяя термин «активатор» на обе группы хемилюминесцирующих реагентов, в то время как авторы [2] термином «активатор» обозначают лишь строго физические активаторы хемилюминесценции.

Однако необходимо указать, что приведенная классификация во многом носит лишь теоретический характер: для большинства люминесцирующих добавок невозможно четко определить, к какой группе их следует относить. Это следствие того, что механизм хемилюминесценции большинства из них изучен недостаточно полно. А простое наблюдение увеличения интенсивности регистрируемой хемилюминесценции в ответ на введение той или иной добавки еще не позволяет отнести эту добавку ни к химическим, ни к физическим активаторам.

Отметим, что усилители хемилюминесценции были разделены на две группы в одной из первых работ, сделанной с их использованием [10]. В ней активаторы разделили на две группы – «плохие», не обладающие химической устойчивостью и тушащие люминесценцию при высоких концентрациях, и «хорошие», обладающие химической устойчивостью и коэффициентом усиления хемилюминесценции, монотонно растущим с увеличением концентрации (формулу расчета коэффициента усиления люминесценции см. в [10]).

НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕРЫ ВЕЩЕСТВ, УСИЛИВАЮЩИХ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ

Впервые явление усиления хемилюминесценции наблюдали при использовании производных антрацена [8–10]. Впоследствии дибромантрацен, являющийся физическим усилителем хемилюминесценции, применяли, например, при изучении распада полимеров при их окислении перекисным соединением [17]; дибромантрацен и дифенилантрацен использовали при изучении хемилюминесценции мозга, индуцированной воздействием аскорбата и гемоглобина [18]. Антрацен использовали при изучении особенностей разложения диоксетанов и диоксетанонов с генерацией ЭВС [13].

Наиболее часто в качестве хемилюминесцирующего реагента применяют люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) [19–28]. В первой половине XX века люминол был известен как вещество, способное к хемилюминесценции при окислении [29]. А в качестве активатора хемилюминесценции в биологической системе люминол впервые применили сотрудники группы под руководством Р. Эллана в 1972 году при изучении иммунной реакции полиморфно-ядерных лейкоцитов [30].

Механизм свечения, возникающего при окислении люминола, заключается в образовании 4-гидроперокси-1-окси-5-аминофталазин-4-олата – гидропероксидного продукта взаимодействия люминола с активными формами кислорода [31], хлораминами в сочетании с пероксидом водорода [32] или окисленными формами пероксида на определенных стадиях пероксидазного каталитического цикла [6]. Это соединение далее самопроизвольно превращается в 2,3-перокси-ди[гидрокси-метиленил]-фениламин, содержащий эндопероксидную группировку, которая в конечном счете разрывается, что приводит к образованию иона гидроаминофталата в ЭВС. Этот ион, переходя в основное состояние, испускает фотон (подробно механизм взаимодействия люминола с различными веществами см. в [6, 31, 33, 34]). Наряду с люминолом иногда применяют изолюминол, который активирует свечение посредством сходного механизма [35–37].

Люминол используется в методе определения общей антиоксидантной активности, в основе которого лежит его реакция с 2,2'-азо-бис(2-амидинпропаном) [38, 39], и в различных хемилюминесцентных методах обнаружения пероксида водорода (см. обзор [40]). В некоторых методиках в качестве хемилюминесцирующих реагентов предполагается использовать одновременно несколько веществ. Так, добавление в систему флуоресцеина повышает интенсивность хемилюминесценции в присутствии люминола [41]. Описано также увеличение интенсивности свечения

[42] при добавлении с систему пероксидаза хрена– H_2O_2 –люминол некоторых фенолов. Однако некоторые фенолы, так называемые non-enhancer phenol, подавляют хемиллюминесценцию в системе пероксидаза хрена– H_2O_2 –люминол–4-йодфенол [43]. В качестве субстратов люминола эти фенолы конкурируют между собой, но не с 4-йодфенолом. Люминол до сих пор наиболее часто применяется при определении иммунореактивности лейкоцитов [37, 44, 45], его используют и в исследовании липопероксидазных реакций [24]. Широкое применение люминола обусловлено большим квантовым выходом его люминесценции, однако усиленная люминолом хемиллюминесценция неспецифична, поэтому, используя люминол, невозможно точно определить, какие именно свободнорадикальные реакции и в каких соотношениях протекают в исследуемом образце.

Существуют и более специфичные хемиллюминесцирующие реагенты, например люциферин–люциферазная система [46] (помимо люциферина люцифераза может иметь и другие субстраты [46]), применяемая для обнаружения молекул АТФ [47], что может использоваться для решения большого количества задач.

Другой специфический химический хемиллюминесцирующий реагент – целентеразин (2-(4-гидроксibenзил)-6-(4-гидрофенол)-8-бензил-3,7-дигидроимидазо[1,2-альфа]пирозин-3-он), с помощью которого определяют содержание супероксидного радикала $O_2^{\cdot -}$.

Один из реагентов, наиболее часто применяемых для детекции супероксидного радикала, – люцигенин [6, 48]. Его, к примеру, можно использовать для изучения окисления ксантина или гипоксантина ксантиноксидазой [49] с целью обнаружения супероксидного радикала, образующегося в ходе работы NADPH-оксидаз [49–52], а также в митохондриях интактных клеток [53] или же в суспензии выделенных митохондрий [54, 55]. В последнее время разработаны методики, в которых люцигенин используется для обнаружения дофамина [56] и глутатиона [57]. В обоих случаях люцигенин входит в состав относительно сложной тест-системы (гипотетические механизмы активации люцигенинзависимой хемиллюминесценции в различных системах подробно рассмотрены в обзоре [6]).

В качестве хемиллюминесцирующего реагента используют также флуоресцеин, обладающий высоким квантовым выходом триплетного возбуждения [58], например, в одной из методик индикации пероксида водорода [40].

Используя в качестве хемиллюминесцирующего реагента бромистый этидий, изучали дезаминирование аминокислот при их окислении H_2O_2 в при-

сутствии Fe^{2+} [59]. Установлено, что в системах, использованных в этой работе, рост концентрации бромистого этидия до 100 мкМ сопровождался увеличением интенсивности люминесценции, которая снижалась при более высоких концентрациях бромистого этидия. Причем бромистый этидий в концентрации 1 мМ в значительной степени замедлял окисление аминокислот.

Хемиллюминесцентные зонды, несмотря на то, что они зачастую вызывают большее усиление свечения, поскольку сами участвуют в процессах, происходящих в изучаемой системе, не пригодны для проведения фундаментальных исследований, к которым относится и изучение процессов пероксидации липидов. В этом случае желательно использовать физические усилители хемиллюминесценции, обеспечивающие увеличение квантового выхода свечения за счет резонансного переноса энергии ЭВС продуктов реакции без химического взаимодействия с участниками и продуктами этой реакции [60–62]. Подобный подход в полной мере соответствует принципу невмешательства в исследуемую систему.

На рис. 1 представлены формулы некоторых веществ, используемых в качестве люминесцирующих реагентов, в ряде исследований.

ПОИСК ФИЗИЧЕСКИХ УСИЛИТЕЛЕЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ, СОПРОВОЖДАЮЩЕЙ РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ

Взаимодействие хемиллюминесцентного зонда с компонентами изучаемой системы представляет большую проблему для их использования в фундаментальных исследованиях, так как при этом анализируется хемиллюминесцентный сигнал не от системы, допустим, липидный субстрат–пероксидаза–пероксид водорода, а от системы липидный субстрат–пероксидаза–пероксид водорода–активатор хемиллюминесценции. Такие данные нельзя считать в полной мере адекватными для переноса их на живые организмы.

Большой вклад в исследование усилителей хемиллюминесценции, специфичных для свободнорадикальных процессов с участием липидов, внес В.С. Шаров. В 1980-х годах была изучена возможность использования различных лантаноидов для усиления хемиллюминесценции. Выдвинуто предположение, что в основе этого процесса лежит межмолекулярный перенос энергии от продуктов, образующихся в ходе свободнорадикальных реакций пероксидов, на 4f-оболочку иона лантаноида [63]. В качестве примера можно привести данные [64], которые позволили сделать вывод о возможности использования ионов тербия Tb^{3+} в качестве физического усилителя хемиллюминесценции

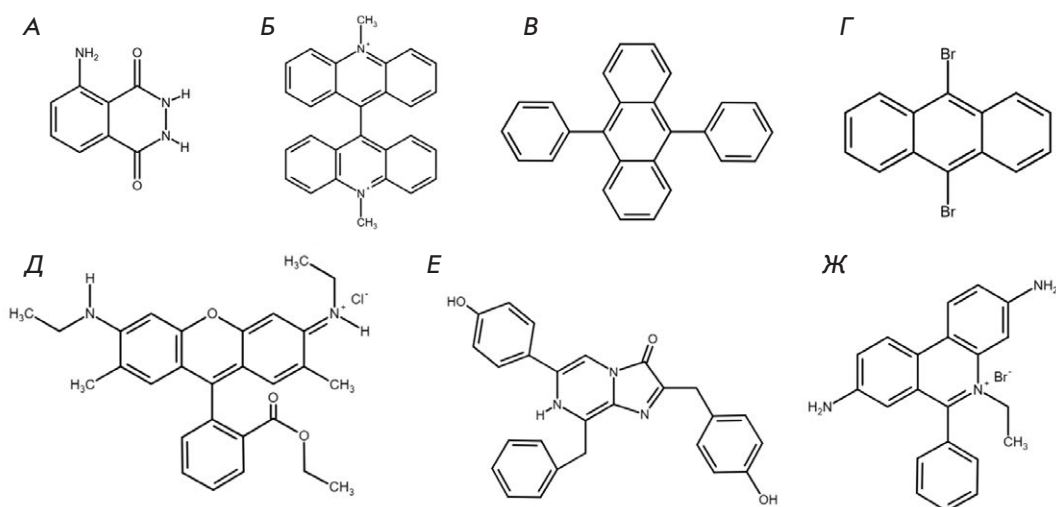


Рис. 1. Формулы некоторых веществ, используемых в качестве химических усилителей (активаторов) хемилюминесценции: люминол (А), люцигенин (Б), 9,10-дифенилантрацен (В), 9,10-дибромантрацен (Г), родамин 6G (Д), целентеразин (Е), бромистый этидий (Ж)

при изучении процессов пероксидации липидов. Несколько раньше показали, что комплекс европия с тетрациклином увеличивает интенсивность хемилюминесценции при перекисном окислении липидов [65]. Однако для проведения исследований в биологических системах ионы лантаноидов не подходят в силу следующих обстоятельств. Еще в 1980-х годах обнаружили затухание хемилюминесценции при использовании ионов лантаноидов в модельных биологических системах. Объяснили это тем, что ионы лантаноидов могут легко образовывать комплексные соединения с веществами буферной среды, в результате чего зачастую пропадает их способность усиливать хемилюминесценцию [65].

Кроме того, изучение механизма возникновения хемилюминесценции, усиленной комплексом Eu^{3+} с 2,2-диметил-6,6,7,7,8,8,8-гептафтор-3,5-октандионом в присутствии диметилдиоксирана (модельного органического пероксида), показало, что комплекс лантаноида химически взаимодействует с этим органическим пероксидом. А данные ЯМР-исследования смеси после реакции и фотофизические характеристики выделенного продукта реакции отличались от свойств исходного хелата европия. Сходные результаты получены и для комплексов Eu^{3+} с 2-теноилтрифторацетоном, 2,2,6,6-тетраметил-3,5-гептандионом (дипивалоилметаном) и трис[3-(трифторметилгидроксиметил)-*d*-камфоратом], причем в случае комплекса с трис[3-(трифторметилгидроксиметил)-*d*-камфоратом] в условиях избытка диметилдиоксирана наблюдалась хемилюминесценция, не свойственная иону Eu^{3+} , а обусловленная неизвестным эмиттером [66].

По-видимому, хемилюминесценция хелатов лантаноидов может быть обусловлена их взаимодействием с органическими пероксидами [67]. Этот вывод подтверждается предположением о ключевой роли диоксиранового интермедиата в развитии

хемилюминесценции при твердофазной реакции пероксимоносульфата калия и гексагидрата нитрата европия в присутствии паров ацетона, хотя непосредственным эмиттером является ион Eu^{3+} [66, 67]. Также стоит сказать, что в реакциях распада органических пероксидов активаторами хемилюминесценции, сходными с ионами Eu^{3+} , являются ионы неодима Nd^{3+} и иттербия Yb^{3+} [66].

Однако необходимо указать, что химическим активатором [66, 67] называют именно комплекс ионов лантаноидов, а не сами ионы, которые испускают фотоны, перехватывая ЭВС с хелатирующего агента.

Таким образом, при поиске оптимального усилителя хемилюминесценции нужно использовать вещества, в молекулах которых с высокой долей вероятности смогут происходить триплет-синглетные переходы. Обусловлено это тем, что продукты, образующиеся при диспропорционировании липопероксидных радикалов, находятся в триплетном ЭВС [11]. Описанные выше комплексы лантаноидов, несмотря на указанные недостатки, удовлетворяют этому требованию. Также данному требованию соответствуют и низкомолекулярные органические вещества, содержащие сопряженные циклические группировки. В качестве примера можно привести гистологический краситель нильский синий, используемый в качестве усилителя хемилюминесценции, сопровождающей окисление липидов, индуцированное ионами Fe^{2+} [68].

При исследовании закономерностей разложения тетраоксанов под действием неорганических солей Fe^{2+} в качестве физического активатора хемилюминесценции с большим квантовым выходом использовали родамин 6G – вещество ксантенового ряда (как доказательство приведено совпадение кинетических зависимостей активированной и собственной хемилюминесценции изучаемой системы) [69]. Сходными свойствами обладают производные кумарина. Специфическими для реакций пероксидации

липидов усилителями хемиллюминесценции являются хинолизидиновые производные кумарина, известные как кумарин-314 (С-314), кумарин-334 (С-334) и кумарин-525 (С-525) [16, 60–62, 70]. В силу селективного усиления хемиллюминесценции, вызванной свободно-радикальными реакциями с участием липидов, именно эти вещества наиболее целесообразно использовать при изучении процессов перекисидации липидов.

Производные кумарина и их применение для регистрации хемиллюминесценции

Кумарины – это группа органических соединений, включающая ненасыщенные ароматические лактоны – производные 5,6-бензо- α -пирона (кумарина, или 5,6-бензо-пиран-2-она) – лактона *цис*-орто-оксикоричной кислоты [71]. Многие представители этой группы веществ используются как лазерные красители [72]. Эффективными флуорофорами с эмиссией в видимой области спектра являются производные кумарина, имеющие заместитель в 7-й позиции (в качестве примера приведены 7-гидрокси-4-метилкумарин и 7-амино-4-метилкумарин) [12].

Привлекают внимание работы, в которых производные кумарина служат индикаторами или частью индикаторной системы. Структурные формулы производных кумарина, применяемых в качестве усилителей хемиллюминесценции, приведены на рис. 2. Одно из производных кумарина, получаемое реакцией конденсации нитрометана и кумаринилового альдегида, показало способность к избирательному специфичному обнаружению анионов цианида [73]. В результате реакции нуклеофильного ароматического замещения цианидом водорода в молекуле кумарина происходит изменение цвета и усиление интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения равна 365 нм) в такой степени, что ее можно наблюдать даже невооруженным глазом. Предел обнаружения составил менее 3 мкМ цианида (в среде ацетонитрила): кумариновая группировка обеспечивает появление ярко-синего флуоресцентного сигнала. Также в качестве хромогенных и флуоресцентных хемосенсоров для обнаружения цианид-аниона и катионов Cu^{2+} можно привести 6,7-дигидрокси-4-метил-8-формилкумарин и 3,4-бензо-7-гидрокси-8-формилкумарин [74]. ДТМС – 7-(4,6-дихлор-1,3,5-триазилил-2-амино)-4-метилкумарин, предложен для определения содержания пероксида водорода хемиллюминесцентным методом [75]. Предел обнаружения пероксида водорода составляет 4×10^{-8} моль/л. Но стоит обратить внимание на высокие значения рН среды (11.4), используемые в этом методе.

Для обнаружения формальдегида было предложено использовать 1-диэтиламинобензо[4,3-*e*]-пиран-2-гидразон (PFM) [76]. Через год был пред-

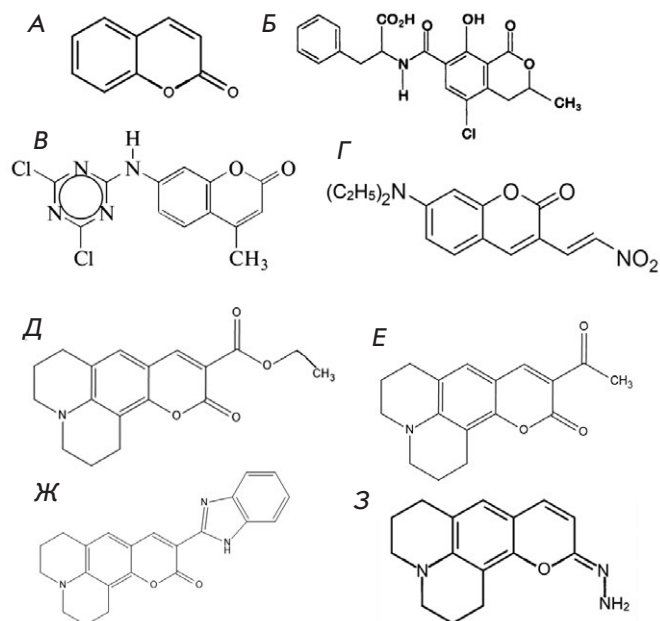


Рис. 2. Кумарин (А) и некоторые его производные: оксатоксин А (Б), ДТМС (В), 3-(2-нитровинил), 7-диэтиламино-кумарин (Г), С-314 (Д), С-334 (Е), С-525 (Ж), PFM4 (З)

ставлен более эффективный люминофор, названный PFM4 (рис. 2, 3) [77]. С его помощью успешно оценено накопление формальдегида в лизосомах клеток, обработанных индукторами стресса эндоплазматического ретикулума [77].

В исследовании, проведенном в 1995 году, изучено влияние различных усилителей на интенсивность хемиллюминесценции, сопровождающей индуцированное ионами железа перекисное окисление фосфолипидов в составе липосом, полученных из яичного желтка. Наибольший эффект показал С-525 (2,3,5,6-1Н,4Н-тетрагидро-9-(2'-бензимидазолил)-хинолизин-(9,9а,1-ГН)), который в концентрации 4 мкМ более чем в 2000 раз увеличивал интенсивность хемиллюминесценции, не влияя при этом на ее кинетику [62]. Механизм усиления свечения в данном случае – это, судя по всему, перенос энергии с молекулы кетона, находящейся в ЭВС (первичного продукта рекомбинации пероксильных радикалов), на флуоресцентный уровень С-525 [60]. При этом нельзя не учесть, что С-525 содержит пуриновую группу, взаимодействие которой со свободными радикалами в определенных условиях приводит к проявлению антиоксидантных свойств у этого вещества [78]. Подобный недостаток имеется и у 2-метил-6-[*p*-метоксифенил]-3,7-дигидроимидазо[1,2-*a*]пиразин-3-она [79] – специфического активатора хемиллюминесценции супероксидного радикала [80].

Однако, несмотря на подобную структуру, С-525 достаточно часто используют в качестве активатора

хемилюминесценции, например, с целью определения гидропероксидов липидов в системе липидный субстрат– Fe^{2+} [16]. На схожей системе с использованием С-334 показано, что хемилюминесценция системы, содержащей комплекс цитохрома с с кардиолинином, обусловлена именно липопероксидазной и квазилипоксигеназной активностью этой наночастицы, а не негемовым железом посредством реакции Фентона [81].

Изучению ЭВС производных кумарина также следует уделить внимание. Определение фотогенерирования радикалов катиона С-314 с использованием наносекундного возбуждения лазером при длинах волн более 400 нм в бензоле, ацетонитриле и дихлорметане позволило обнаружить триплетное ЭВС С-314 с максимальным поглощением на длине волны 550 нм и временем жизни 90 мкс в бензоле, которое легко гасится кислородом [82]. В водной среде возбужденное состояние не обнаружено, но зато идентифицирован относительно долгоживущий (160 мкс в растворах с уравновешенным воздухом) катионный свободный радикал С-314 с максимумом поглощения на длине волны 370 нм. Кроме того, показано тушение этих катионных свободных радикалов С-314 фенольными антиоксидантами; константа скорости этой реакции оказалась больше $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [82]. Согласно [82], эта реакция протекает по механизму переноса электронов между фенольным антиоксидантом и катион-радикалом С-314, причем возможно и образование ионных пар.

Изучение растворения С-314 в водной среде с добавлением поверхностно-активного вещества [83] выявило наличие двух хорошо дифференцированных межфазных сред (вода/воздух). Автором настоящего обзора показано, что С-314, С-334 и С-525 в концентрациях выше 50 мкМ в воде не растворяются, при этом оптимальным диапазоном концентраций производного кумарина в системе является 20–25 мкМ. Согласно [83] добавление поверхностно-активного вещества способствовало сольватации С-314. При этом выявлено два различных положения молекул С-314 относительно пространственных доменов поверхностно-активного вещества в результате больших флуктуаций концентрации поверхностно-активных веществ, которые имеют место при небольшой «зоне покрытия», обычно называемой «пространством двумерного газожидкостного сосуществования» [83].

С помощью хемилюминесценции, активированной С-525, изучены механизмы действия различных антиоксидантов: β -каротина, токоферола, рутина и аскорбата – подавления ими перекисного окисления липидов, запускаемого свободными ионами двухвалентного железа [84]. При использовании метода усиленной С-525 хемилюминесценции были из-

учены физико-химические свойства липопротеинов низкой плотности плазмы крови. Показано повышение амплитуды быстрой вспышки люминесценции для окисленных липопротеинов в среде, содержащей катионы Fe^{2+} [61]. Методом регистрации хемилюминесценции, усиленной С-525, изучено свободнорадикальное окисление кардиолипина в составе его комплекса с цитохромом с [70].

Интересны результаты сравнения кумарина С-525 как усилителя хемилюминесценции с хлорофиллом-а [72]. Квантовый выход свечения при использовании С-525 оказался гораздо выше. Наблюдалось усиление на 2–3 порядка хемилюминесценции, сопровождающей индуцированное трет-бутилгидропероксидом окисление микросом из печени крысы и перекисное окисление липосомных липидов. Отмечается, что производные кумарина активируют хемилюминесценцию за счет переноса энергии от карбониллов, находящихся в триплетном ЭВС, образующихся в реакции пероксидного радикала через механизм Расселла или при разложении диоксетана.

Необходимо отметить весьма существенный недостаток хинолизиновых производных кумарина: С-525 теряет способность к люминесценции в сыворотке крови [55]. Предполагается, что это обусловлено связыванием С-525 с сывороточными альбуминами.

Неоднократно сообщалось, что С-314, С-334 и С-525 являются люминофорами, не реагирующими с компонентами исследуемой смеси [16, 60–62, 70]. И хотя данный вывод получен в системе, в которой шла неферментативная пероксидация липидов [62], он по умолчанию переносится и на системы, в которых этот процесс запускается пероксидазой, несмотря на то, что В.С. Шаров и соавт. еще в 1996 году сообщили, что С-525 не подходит для изучения пероксидации липидов, катализируемой пероксидазой хрена, в силу его нестабильности в этой системе [72].

Данные о том, что хинолизиновые производные кумарина служат субстратами пероксидазной реакции, подтверждены в работах [85, 86], в которых показано статистически значимое снижение концентрации С-314, С-334 и С-525 в ходе пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином. Снижение концентрации кумариновых производных в процессе ферментативной липидной пероксидации приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, что может привести к ошибочной интерпретации данных: исследователь может сделать ложный вывод о снижении интенсивности процесса перекисного окисления липидов. В случае изучения, к примеру, антиоксидантов, такая ложная трактовка приведет к ошибочному суждению об эффективности подавления исследуемым

веществом липидной перекисидации. Чтобы этого избежать при проведении опыта по измерению хемиллюминесценции, сопровождающей липидную перекисидацию и усиленной производными кумарина, нужно умножать зарегистрированные хемиллюминетром значения ее интенсивности на поправочные на снижение концентрации производных кумарина коэффициенты для соответствующих моментов времени от начала реакции. Эти коэффициенты следует вычислять, используя математическую функцию, обратную убывающей функции доли концентрации производных кумарина от времени реакции.

При этом следует также убедиться, что реакция между производным кумарина и пероксидазой не сопровождается люминесценцией. В противном случае в функцию вычисления поправочных коэффициентов необходимо также добавлять дополнительные коэффициенты, нивелирующие вклад в зарегистрированные прибором значения люминесценции свечения, обусловленного реакцией усилителя хемиллюминесценции с пероксидазой, не имеющих отношения к свечению, сопровождающему перекисное окисление липидов.

При корректировке при помощи обсуждаемых поправочных функций зарегистрированных прибором хемиллюминесцентных кривых их можно будет приводить в такой вид, который бы они имели в случае постоянства концентрации усилителя хемиллюминесценции в системе. Следовательно, станет возможной адекватная оценка процессов ферментативного перекисного окисления липидов, имеющих место в исследуемой пробе. ●

Автор настоящего обзора благодарит Н.П. Лысенко, профессора кафедры радиобиологии и биофизики имени академика А.Д. Белова ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, за помощь в подготовке англоязычной версии статьи и заведующего кафедрой медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова академика РАН Ю.А. Владимирову за консультации по вопросам механизмов активации хемиллюминесценции и рекомендации по анализу научной литературы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Romodina L.A. // Acta Naturae. 2021. V. 13. № 3(50). P. 90–100.
- Журавлев А.И., Зубкова С.М. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. М.: Белье альвы, 2014. 304 с.
- Piryazev A.P., Azizova O.A., Aseichev A.V., Dudnik L.B., Sergienko V.I. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. V. 156. № 1. P. 101–103.
- Meier B., Radeke H.H., Selle S., Habermehl G.G., Resch K., Sies H. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1990. V. 371. № 10. P. 1021–1025.
- Bryan P.D., Capomacchia A.C. // J. Pharm. Biomed. Analysis. 1991. V. 9. № 10–12. P. 855–860.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49. С. 341–388.
- Байматов В.Н., Фархутдинов Р.Р., Багаутдинов А.М. Хемиллюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в сельском хозяйстве, ветеринарной медицине и животноводстве. Уфа: «Здравоохранение Башкортостана», 2009. 104 с.
- Vassil'ev R.F. // Nature. 1963. V. 200. № 4908. P. 773–774.
- Vassil'ev R.F. // Nature. 1962. V. 196. № 4855. P. 668–669.
- Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А., Черкасов А.С. // ДАН СССР. 1963. Т. 149. № 1. С. 124–127.
- Belyakov V.A., Vassil'ev R.F. // Photochem. Photobiol. 1970. V. 11. № 3. P. 179–192.
- Мартынов В.И., Пахомов А.А., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. // Acta Naturae. 2016. Т. 8. № 4(31). С. 37–51.
- Augusto F.A., Frances-Monerris A., Fdez Galvan I., Roca-Sanjuan D., Bastos E.L., Baader W.J., Lindh R. // Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP. 2017. V. 19. № 5. P. 3955–3962.
- Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебное пособие для медицинских и биологических спец. вузов. Москва: Высшая школа, 1989. 199 с.
- Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmajlov D.Yu. // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. V. 144. № 3. P. 390–396
- Волкова П.О., Алексеев А.В., Джатдоева А.А., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // Вест. МГУ. Сер. 2: Химия. 2016. Т. 57. № 1. С. 41–52.
- Phillips D., Anissimov V., Karpukhin O., Shlyapintokh V. // Photochem. Photobiol. 1969. V. 9. № 2. P. 183–187.
- Prat A.G., Turrens J.F. // Free Radical Biol. Med. 1990. V. 8. № 4. P. 319–325.
- Zhao C., Cui H., Duan J., Zhang S., Lv J. // Analyt. Chem. 2018. V. 90. № 3. P. 2201–2209.
- Zhang A., Guo W., Ke H., Zhang X., Zhang H., Huang C., Yang D., Jia N., Cui D. // Biosensors Bioelectronics. 2018. V. 101. P. 219–226.
- Saqib M., Qi L., Hui P., Nsabimana A., Halawa M.I., Zhang W., Xu G. // Biosensors Bioelectronics. 2018. V. 99. P. 519–524.
- Mayer M., Takegami S., Neumeier M., Rink S., Jacobi von Wangelin A., Schulte S., Vollmer M., Griesbeck A.G., Duerkop A., Baeumner A.J. // Angewandte Chemie. 2018. V. 57. № 2. P. 408–411.
- Li F., Ma W., Liu J., Wu X., Wang Y., He J. // Analyt. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. № 2. P. 543–552.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Демин Е.М., Матвеева Н.С., Любичкий О.Б., Новиков А.А., Измайлов Д.Ю., Осипов А.Н., Тихонов В.П., Каган В.Е. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 3. С. 372–379.
- Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // Вест. МГУ. Сер. 2: Химия. 2008. Т. 49. № 5. С. 354–360.
- Mostafa I.M., Halawa M.I., Chen Y., Abdussalam A., Guan Y., Xu G. // Analyst. 2020. V. 145. № 7. P. 2709–2715.
- Хабибуллин Р.Р., Федосов А.В. // Баш. хим. журн. 2006. Т. 13. Вып. 2. С. 106–107.
- Zhang X., Zhang H., Xu S., Sun Y. // Analyst. 2014. V. 139.

- № 1. P. 133–137.
29. Huntress E., Stanley L., Parker A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1934. V. 56. № 1. P. 241–242.
30. Allen R.C., Stjernholm R.L., Steele R.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 47. № 4. P. 679–684.
31. Рошупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А. // *Биофизика*. 2006. Т. 51. № 1. С. 99–107.
32. Мурина М.А., Белакина Н.С., Рошупкин Д.И. // *Биофизика*. 2004. Т. 49. № 6. С. 1099–1105.
33. Arnhold J., Mueller S., Arnold K., Sonntag K. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1993. V. 8. № 6. P. 307–313.
34. Mueller S., Arnhold J. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1995. V. 10. № 4. P. 229–237.
35. Проскурнина Е.В., Джатдоева А.А., Лобиченко Е.Н., Шаплина Р.И., Владимиров Ю.А. // *Журн. аналит. химии*. 2017. Т. 72. № 7. С. 639–644.
36. Ji X., Wang W., Li X., Chen Y., Ding C. // *Talanta*. 2016. V. 150. P. 666–670.
37. Dahlgren C., Bjornsdottir H., Sundqvist M., Christenson K., Bylund J. // *Meth. Mol. Biol.* 2020. V. 2087. P. 301–324.
38. Селиверстова Е.Ю., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Майоров Е.Л. // *Валеология*. 2014. № 4. С. 26–34.
39. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. // *Биофизика*. 2011. Т. 56. № 6. С. 1081–1090.
40. Цаплев Ю.Б. // *Журн. аналит. химии*. 2012. Т. 67. № 6. С. 564–572.
41. Navas Diaz A., Gonzalez Garcia J.A., Lovillo J. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1997. V. 12. № 4. P. 199–205.
42. Hodgson M., Jones P. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1989. V. 3. № 1. P. 21–25.
43. Candy T.E., Jones P. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1991. V. 6. № 4. P. 239–243.
44. Torabi R., Ghourchian H. // *Sci. Repts.* 2020. V. 10. № 1. P. 594.
45. Chen M.S., Lu P.K., Lin W.C., Shin H.C., Sie S.R., Sheu S.M. // *Lipids*. 2020. V. 55. № 1. P. 45–52.
46. Lee J., Muller F., Visser A. // *Photochem. Photobiol.* 2019. V. 95. № 3. P. 679–704.
47. Dubyak G.R. // *Meth. Enzymol.* 2019. V. 629. P. 81–102.
48. Greenlee L., Fridovich I., Handler P. // *Biochemistry*. 1962. V. 1. P. 779–783.
49. Storch J., Ferber E. // *Analyt. Biochem.* 1988. V. 169. № 2. P. 262–267.
50. Bhunia A.K., Han H., Snowden A., Chatterjee S. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 25. P. 15642–15649.
51. Irani K., Xia Y., Zweier J.L., Sollott S.J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont P.J. // *Science*. 1997. V. 275. № 5306. P. 1649–1652.
52. Allen R.C. // *Meth. Enzymol.* 1986. V. 133. P. 449–493.
53. Rembish S.J., Trush M.A. // *Free Rad. Biol. Med.* 1994. V. 17. № 2. P. 117–126.
54. Джатдоева А.А., Полимова А.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // *Вест. Рос. гос. мед. ун-та*. 2016. № 1. С. 54–60.
55. Матвеева Н.С. Активированная хемилюминесценция как метод изучения свободнорадикальных реакций в клетках и тканях: Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2012. 204 с.
56. Lan Y., Yuan F., Fereja T.H., Wang C., Lou B., Li J., Xu G. // *Analyt. Chem.* 2019. V. 91. № 3. P. 2135–2139.
57. Halawa M.I., Wu F., Zafar M.N., Mostafa I.M., Abdussalam A., Han S., Xu G. // *J. Materials Chem. B*. 2019. V. 8(16). P. 3542–3549.
58. Demissie A.A., Dickson R.M. // *J. Phys. Chem. A*. 2020. V. 124. № 7. P. 1437–1443.
59. Воейков В.Л., Баскаков И.В. // *Биофизика*. 1995. Т. 40. № 6. С. 1150–1157.
60. Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu.A. // *Biofizika*. 1995. V. 40. № 2. P. 428–433.
61. Vladimirov Iu.A., Sherstnev M.P., Azimbaev T.K. // *Biofizika*. 1995. V. 40. № 2. P. 323–327.
62. Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. // *Free Rad. Biol. Med.* 1995. V. 18. № 4. P. 739–745.
63. Шаров В.С., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1982. Т. 27. С. 327–329.
64. Шаров В.С., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1984. Т. 29. № 3. С. 394–397.
65. Шаров В.С., Суслова Т.Б., Деев А.И., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1980. Т. 25. С. 923–924.
66. Сафаров Ф.Э. Хемилюминесценция комплексов лантаноидов в реакциях с органическими пероксидами. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Уфа, 2011.
67. Казаков Д.В., Казаков В.П., Сафаров Ф.Э., Остахов С.С., Ахмадеева Г.Х. // *Баш. хим. журн.* 2007. Т. 14. № 1. С. 69–70.
68. Шерстнев М.П., Азимбаев Т.К., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1995. № 40. С. 531–535.
69. Галимов Д.И., Назыров Т.И., Бидалова С.Р., Газеева Д.Р., Булгаков Р.Г. // *Вестн. Баш. ун-та*. 2015. Т. 20. Вып. 3. С. 841–844.
70. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. // *Биол. мембраны*. 2009. Т. 26. № 6. С. 493–504.
71. Выделение и анализ природных биологически активных веществ. Томск: изд-во Томского ун-та, 1987. 184 с.
72. Sharov V.S., Briviba K., Sies H. // *Free Rad. Biol. Med.* 1996. V. 21. № 6. P. 833–843.
73. Kim G.J., Kim H.J. // *Tetrahedron Lett.* 2010. V. 51. № 10. P. 185–187.
74. Николаева О.Г., Ревинский Ю.В., Тихомирова К.С., Дмитриева О.И., Дубоносос А.Д., Брень В.А. // *Наука Юга России*. 2018. Т. 14. № 2. С. 14–19.
75. Ma Q., Ma H., Wang Z., Su M., Xiao H., Liang S. // *Talanta*. 2001. V. 53. № 5. P. 983–990.
76. Liang X.G., Chen B., Shao L.X., Cheng J., Huang M.Z., Chen Y., Hu Y.Z., Han Y.F., Han F., Li X. // *Theranostics*. 2017. V. 7. № 8. P. 2305–2313.
77. Liang X.G., Cheng J., Qin S., Shao L.X., Huang M.Z., Wang G., Han Y., Han F., Li X. // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. № 85. P. 12010–12013.
78. Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., Saxena S., Bayir H., et al. // *Free Rad. Biol. Med.* 2014. V. 71. P. 221–230.
79. Tampo Y., Tsukamoto M., Yonaha M. // *FEBS Lett.* 1998. V. 430. № 3. P. 348–352.
80. Imada I., Sato E.F., Miyamoto M., Ichimori Y., Minamiyama Y., Konaka R., Inoue M. // *Analyt. Biochem.* 1999. V. 271. № 1. P. 53–58.
81. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н. // *Изв. Межд. акад. аграрного образования*. 2018. № 42. Т. 1. С. 102–106.
82. Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S.I., Scaiano J.C. // *J. Phys. Chem. A*. 2012. V. 116. № 1. P. 199–206.
83. Pantano D.A., Sonoda M.T., Skaf M.S., Laria D. // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. № 15. P. 7365–7372.
84. Vasiljeva O.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. // *Membr. Cell Biol.* 1998. V. 12. № 2. P. 223–231.
85. Ромодин Л.А., Шангин С.В., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Храмов А.П. // *Изв. Межд. акад. аграрного образования*. 2018. № 42. Т. 1. С. 118–123.
86. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Шангин С.В., Владимиров Г.К., Лысенко Н.П., Демихов Е.И. // *Биофизика*. 2020. Т. 65. № 4. С. 680–690.