

**И.П. Иванова<sup>1</sup>, И.М. Пискарев<sup>2</sup>**

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЕАКЦИИ ФЕНТОНА ДЛЯ ОЦЕНКИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ АЛЬБУМИНА И ГЕМОГЛОБИНА

<sup>1</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup>НИИ ядерной физики имени Д.В. Скobelьцына, МГУ, Москва, Россия

Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, позволяет наблюдать продукты реакции, а не радикалы. Реакция Фентона протекает практически в любом субстрате. Уровень светосуммы хемилюминесценции, инициированной гидроксильными радикалами – реакцией Фентона, определяется константами скорости реакций инициирования, продолжения и обрыва цепи. Увеличение или уменьшение светосуммы хемилюминесценции свидетельствует о разных значениях этих констант, но не указывает на антиоксидантную активность, т.е. на подавление цепной реакции путем образования неактивных продуктов. Поэтому по уровню хемилюминесценции, индуцированной гидроксильными радикалами, образующимися в реакции Фентона, можно оценить способность субстрата к окислению в данных условиях. Светосумма в реакции Фентона характеризует способность субстрата к окислению, и в общем случае она никак не связана с антиоксидантной способностью пробы.

**Ключевые слова:** реакция Фентона, окислительная способность

The chemiluminescence induced by Fenton reaction allows detecting reaction products, but not radicals. Fenton reaction can take place in any substratum. Value of chemiluminescence's light sum in Fenton reaction is determined by reactions rate constants of all stage chain oxidation: initiation, propagation and termination of chain. The increasing or decreasing of luminescence light sum means a difference in these constants but not means the antioxidant activity. It doesn't mean the termination of chain reaction with stable products formation. Therefore, according to value of chemiluminescence's induced in Fenton reaction we can evaluate the capability of substratum to oxidation for given conditions. The light sum in Fenton reaction is the capability of substratum to oxidation and it is not proportional to antioxidant activity of sample.

**Key words:** Fenton reaction, oxidation capability

**Введение.** Реакция Фентона широко применяется в практике биомедицинских исследований. Основное преимущество метода в его оперативности. При исследовании индуцированной реакцией Фентона хемилюминесценции можно выделить два режима работы, когда  $[Fe^{2+}] \geq [H_2O_2]$  и  $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$ . В первом случае двухвалентное железо окисляется до трехвалентного, двухвалентное железо расходуется, и время реакции определяется исходной концентрацией железа. Во втором случае, при  $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$ , окисленное трехвалентное железо регенерируется обратно в двухвалентное. На это расходуется перекись водорода. Случай  $[Fe^{2+}] \geq [H_2O_2]$  был рассмотрен в работе [1]. Представляет интерес исследовать характеристики светосуммы хемилюминесценции, индуцированной реакцией, Фентона для случая  $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$  и сравнить их с характеристиками при  $[Fe^{2+}] \geq [H_2O_2]$ . Целью работы является измерение и расчет кинетики хемилюминесценции при  $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$ , анализ информации об окислительной способности и антиоксидантной активности субстрата.

**Материалы и методы.** Измерения хемилюминесценции индуцированной, реакцией Фентона осуществляли с помощью биохемилюминометра БХЛ-07 (Н. Новгород, 2010 г.) в 10-15 пробах. Время регистрации 30 секунд. Для реакции Фентона использовались реагенты:

раствор  $\text{FeSO}_4$   $10^{-3}$  моль/л в кислой среде  $\text{pH} = 2$ , раствор перекиси водорода  $10^{-3}$  и  $10^{-1}$  моль/л.

Исследовалась индуцированная реакцией Фентона хемилюминесценция альбумина и гемоглобина. Концентрации альбумина 50 г/л ( $7 \cdot 10^{-4}$  моль/л) и гемоглобина 70 г/л ( $1.1 \cdot 10^{-3}$  моль/л). Все реагенты химически чистые, дважды дистиллированная вода  $\text{pH} = 6.5$ , стерильный раствор Хенкса (фирмы Биолот).

Регистрацию светосуммы хемилюминесценции проводили следующим образом: регистрировали хемилюминесценцию реакции Фентона без субстрата -  $S_0$ , затем хемилюминесценцию исследуемых субстратов -  $S$ , далее субстраты последовательно разбавляли раствором Хенкса или водой в 10 раз, получали светосуммы при концентрациях  $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$  от исходной. Для расчета кинетики процессов хемилюминесценции составлялась схема реакций, которая описывает процесс. На основе схемы реакций составлялась система дифференциальных уравнений, где переменными являлись концентрации участвующих в процессе веществ. В каждое уравнение входят скорости накопления и расходования вещества, концентрация которого рассматривается как переменная. Число уравнений равно суммарному числу исходных и промежуточных веществ, участвующих в реакции. Для решения системы дифференциальных уравнений использовался пакет программ MathCad 14.

### **Результаты.**

**Случай 1:**  $[\text{Fe}^{2+}] \geq [\text{H}_2\text{O}_2]$ ,  $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$  моль/л, концентрация перекиси водорода  $10^{-3}$  моль/л. Зависимость светосуммы хемилюминесценции альбумина при последовательных разведениях пробы в 10 раз исследована экспериментально. Светосумма достигает максимума при разбавлении  $-1$ , для исходной концентрации (разбавление  $0$ ) светосумма меньше, а при более сильных разбавлениях ( $-2, -3, -4$ ) светосумма также уменьшается. Для гемоглобина ситуация аналогичная, но максимум хемилюминесценции наблюдается при разбавлении  $-2$ . Эффект уменьшения хемилюминесценции при большой концентрации RH в обоих случаях связан с расходованием  $\text{ROO}^\bullet$  в реакции  $\text{ROO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\bullet$ . Результатом анализа является светосумма при разведении, когда достигается максимум хемилюминесценции.

**Случай 2:**  $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$ ,  $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$  моль/л, концентрация перекиси водорода  $10^{-1}$  моль/л. Когда концентрация перекиси водорода больше концентрации железа, двухвалентное железо, окисленное до трехвалентного в реакции Фентона, регенерируется (восстанавливается) в двухвалентное. При этом расходуется перекись, и процесс будет продолжаться до тех пор, пока перекись полностью не израсходуется. Продолжительность реакции определяется концентрацией перекиси водорода, и она будет превышать 30 секунд (выбранное время измерения хемилюминесценции). Концентрация двухвалентного железа не падает быстро, как в случае 1, а за счет регенерации поддерживается на почти постоянном уровне. Из-за ограниченного быстродействия регистрирующей аппаратуры часть светосуммы, высыпившейся во время переднего фронта импульса хемилюминесценции, теряется, но зато зарегистрированная светосумма пропорциональна полному выходу продуктов цепной реакции. При стабильном воспроизведении условий эксперимента в разных опытах светосумма будет пропорциональна полной окислительной способности пробы. В случае 2 нет необходимости выполнять последовательные разведения, результатом исследования является светосумма при исходной концентрации пробы.

Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, позволяет наблюдать продукты реакции, а не радикалы. Реакция Фентона протекает практически в любом субстрате. Уровень светосуммы хемилюминесценции, инициированной гидроксильными радикалами – реакцией Фентона, определяется константами скорости реакций инициирования, продолжения и обрыва цепи. Увеличение или уменьшение светосуммы хемилюминесценции свидетельствует о разных значениях этих констант, но не указывает на антиоксидантную активность, т.е. на подавление цепной реакции путем образования неактивных продуктов. Поэтому по уровню хемилюминесценции, индуцированной гидроксильными радикалами,

образующимися в реакции Фентона, можно оценить способность субстрата к окислению в данных условиях.

**Выводы.** Продуктом цепной реакции являются гидроперекись и синглетный кислород. Характеристики хемилюминесценции, возникающей в реакции Фентона, определяются соотношением концентраций двухвалентного железа и перекиси водорода.

При  $[Fe^{2+}] \geq [H_2O_2]$  двухвалентное железо расходуется, светосумма хемилюминесценции определяется выходом светящихся продуктов (синглетного кислорода). Время реакции определяется концентрацией двухвалентного железа. Образующиеся в цепной реакции гидроперекиси остаются не идентифицированными.

При  $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$  окисленное до трехвалентного состояния железо регенерируется в двухвалентное. Время реакции определяется концентрацией перекиси водорода. Светосумма хемилюминесценции пропорциональна суммарному выходу гидроперекиси и синглетного кислорода. Светосумма увеличивается с ростом концентрации окисляющихся групп RH и уменьшается с ростом концентрации ингибитора InH и гидроперекиси ROOH, уже накопленной в пробе.

Светосумма в реакции Фентона характеризует способность субстрата к окислению, и в общем случае она никак не связана с антиоксидантной способностью пробы.

#### Список литературы:

1. Пискарев И.М., Трофимова С.В., Бурхина О.Е., Иванова И.П. Исследование уровня свободнорадикальных процессов в субстратах и биологических образцах с помощью индуцированной хемилюминесценции // Биофизика.-2015.-Т.60-№3-С.253-256.