

УДК 577.3

ХЛОРОФИЛЛИН ИНГИБИРУЕТ ЛИПИДНУЮ ПЕРОКСИДАЦИЮ, ЗАПУСКАЕМУЮ РЕАКЦИЕЙ ФЕНТОНА

© 2024 г. Л.А. Ромодин*.*#

*Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Живописная, 46, Москва, 123098, Россия

#E-mail: fmbc-fmba@bk.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

При помощи реакции Фентона смоделирована система, в которой образуются частицы, аналогичные таковым при радиолизе воды. Методом регистрации хемилюминесценции оценена супрессия под действием хлорофиллина реакций, вызванных образующимися в системе гидроксильными радикалами. Показано, что натрий-медный хлорофиллин дозозависимо угнетает хемилюминесценцию, сопровождающую индуцированное реакцией Фентона перекисное окисление фосфатидной кислоты. На основании этого можно сделать вывод, что медный хлорофиллин может угнетать метаболизм липидных радиотоксинов – липидную пероксидацию, вызванную атакой продуктов радиолиза воды на липидные молекулы.

Ключевые слова: реакция Фентона, гидроксильный радикал, гидропероксильный радикал, хлорофилл, хлорофиллин, антиоксидант, перекисное окисление липидов, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302924010013, EDN: RLUA AO

Радиозащитные свойства препаратов на основе хлорофилла были независимо обнаружены несколькими научными коллективами на абсолютно различных экспериментальных моделях. В статье [1] обобщен и обсужден экспериментальный материал, представленный в работах данных исследователей. Среди них можно отметить работу [2], авторы которой подробно изучили антиоксидантное действие хлорофиллина (водорастворимого продукта омыления хлорофилла) при воздействии γ -излучения, и работы [3, 4], выполненные на базе Московской академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина под руководством профессора Н.П. Лысенко. Для различных доз γ -излучения был определен фактор изменения дозы (отношение дозы излучения, вызывающей гибель половины получивших препарат хлорофилла животных, к дозе, смертельной для половины особей, не получивших его), находящийся в диапазоне 2–4 для различных доз излучения [3].

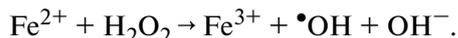
На основании данных о снижении содержания малонового диальдегида у облученных животных под действием препарата на основе хлорофилла

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, ХЛ – хемилюминесценция, Cu-Ch – натрий-медный хлорофиллин.

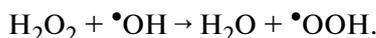
[2, 3] и данных хемилюминесцентного исследования с моделированием метаболизма липидных радиотоксинов [4] можно предполагать, что подавление перекисного окисления липидов (ПОЛ) является компонентом радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла.

Однако в работе [4] ПОЛ запускалось ферментативно, с использованием комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, катализировавшего квазилипоксигеназную реакцию. В процессе этого в системе образовывалось большое количество липоксильных и липидных (условно алкильных) радикалов [5], имеющих в кислородной среде тенденцию к превращению в липопероксильные радикалы [6]. Непосредственно развитие каскада ПОЛ в данном случае не отличается от имеющего место при действии радиации [7, 8], однако сам процесс индукции данного каскада имеет отличия: в модельной системе из работы [4] липидную молекулу окислял цитохром *c*, а при действии радиации, кроме случаев прямого радиолиза биомолекул, липиды окисляются продуктами радиолиза воды – гидроксильными и пероксильными радикалами [7, 8].

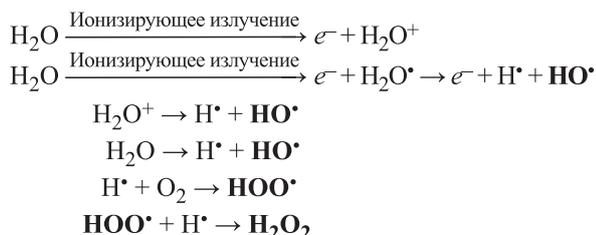
Смоделировать данный процесс возможно в системе, в которой протекает реакция Фентона. Ее уравнение можно представить следующим образом [9]:



Образование гидропероксильного радикала возможно по реакции:



Данную систему вполне можно считать модельной для процессов радиолитического разложения воды, так как в ней присутствуют те же активные формы кислорода, что и при нем [8]:



В приведенных выше реакциях, имеющих место при радиолитическом разложении воды, жирным шрифтом выделены формулы веществ, присутствующих в системе, в которой протекает реакция Фентона. Таким образом, данную систему с определенными допущениями можно использовать для моделирования процессов, имеющих место при действии ионизирующего излучения.

Активные формы кислорода, образовавшиеся в процессе радиолитического разложения воды, атакуют в живых клетках молекулы биополимеров и липидов, обуславливая тем самым развитие лучевого поражения на уровне клетки [7]. Окисление молекулы липида является триггером для запуска каскада

реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ), проиллюстрированного на рис. 1.

Ввиду того что в эукариотических клетках практически повсеместно присутствуют мембранные структуры, крайне важной составляющей данного поражения является развивающаяся липидная пероксидация [10], поэтому фактор, влияющий на течение данного процесса, может аналогичным образом повлиять и на тяжесть лучевого поражения.

На основании вышесказанного было спланировано исследование способности хлорофиллина ингибировать ПОЛ, индуцированное протекающей в растворе реакцией Фентона как источника активных форм кислорода, аналогичных продуктам радиолитического разложения воды.

Течение свободнорадикальных реакций можно анализировать методом регистрации хемилюминесценции (ХЛ), позволяющим оценить их скорость [11].

Реакция Фентона в водном растворе сопровождается свечением, обусловленным реакциями с образованием и участием синглетного кислорода [9, 12]. Однако наибольший вклад в свечение, испускаемое используемой нами экспериментальной модельной системой, вносит хемилюминесценция, сопровождающая ПОЛ. Свечение возникает при переходе возбужденных продуктов ПОЛ в основное состояние. Механизм его возникновения показан на рис. 2 [13].

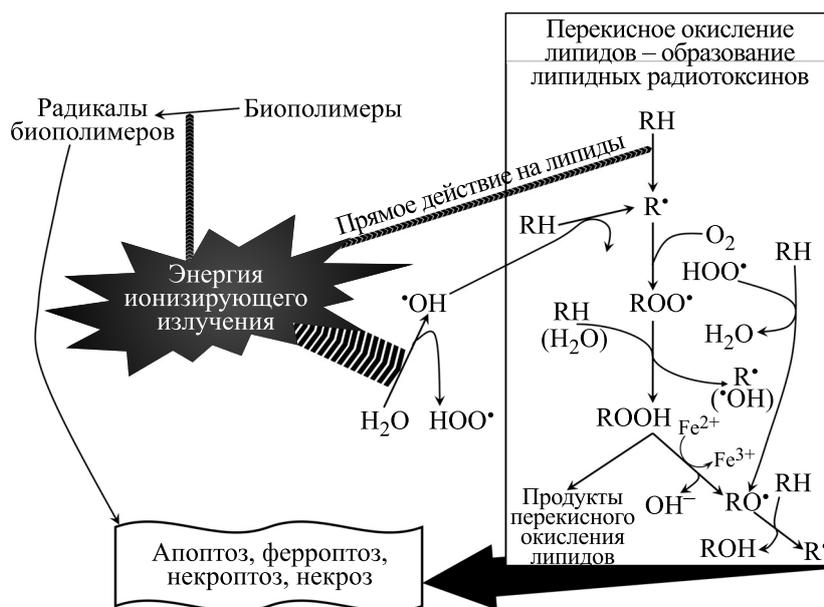


Рис. 1. Механизм биологического действия ионизирующего излучения, обуславливающий развитие каскада реакций липидной пероксидации.

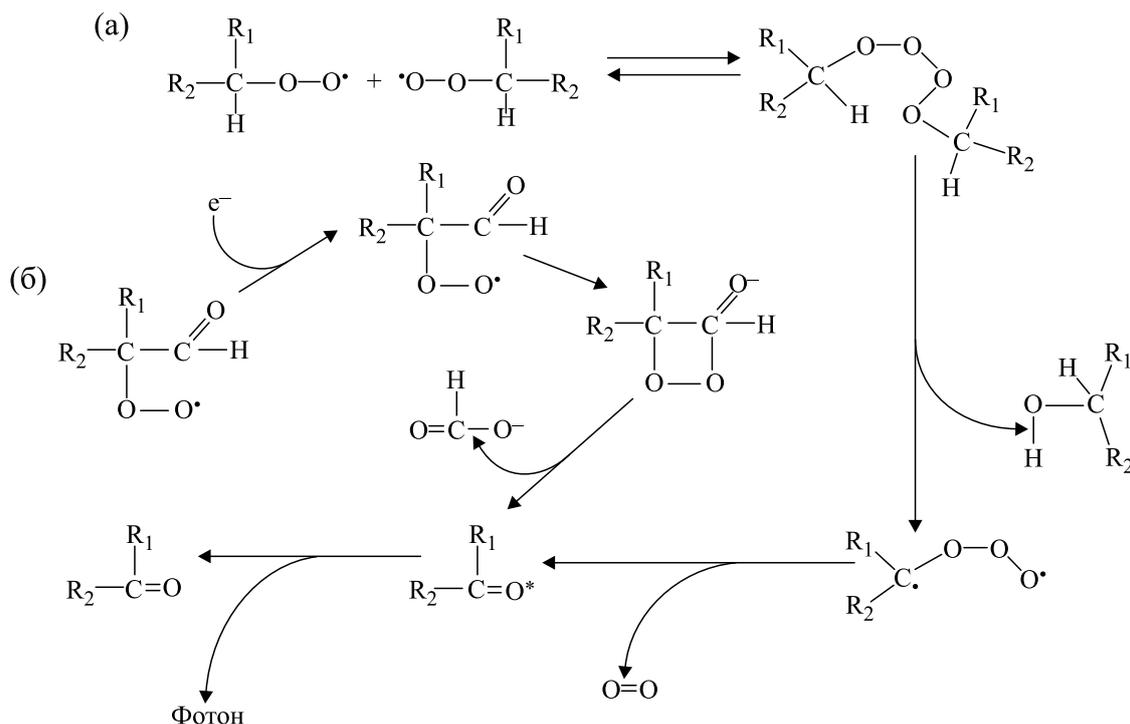


Рис. 2. Основные механизмы высвечивания фотонов в результате окисления липидов: (а) – реакция диспропорционирования пероксильных радикалов, (б) – образование и распад диоксетановой группировки (на схеме – диоксетанон) [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрация хемилюминесценции была проведена на установке для регистрации сверхслабых свечений, разработанной профессором А.И. Журавлёвым при участии сотрудников МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина (Москва) [14]. Перед измерениями проводили ее калибровку относительно эталона ЖС-19 № 35, который, согласно паспорту, испускает 859 тысяч квантов в секунду.

В кювету хемилюминометра вносили 200 мкл 5 мМ раствора FeSO₄ (АО «РЕАХИМ», Россия), 400 мкл спиртового раствора натриевой соли дилинолеилфосфатидной кислоты (Merck, США), 400 мкл раствора натрий-медного хлорофиллина (сокр. Cu-Ch, Macklin, Китай) в различных концентрациях (в контрольном опыте вместо него вносили дистиллированную воду), 2600 мкл дистиллированной воды. Далее проводили регистрацию хемилюминесцентного сигнала в течение 30 с, после чего в кювету добавляли 400 мкл 2.5 мМ раствора H₂O₂ («Белмедпрепараты», Беларусь). После этого проводили регистрацию ХЛ-сигнала в течение 300 с. Измерение для каждой пробы было проведено по 8 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие хлорофиллина вызывало снижение интенсивности ХЛ, сопровождающей ПОЛ, индуцированное протеканием в системе реакции Фентона. Данный результат проиллюстрирован на рис. 1: указанное снижение интенсивности свечения видно как по непосредственным ХЛ-кривым (рис. 1а), так и по значениям светосуммы – площади между ХЛ-кривой и осью абсцисс (рис. 1б).

Достоверное снижение интенсивности ХЛ наблюдается уже при концентрациях хлорофиллина менее 1 мкМ. Этот результат в целом согласуется с данными, полученными на модели ферментативного ПОЛ, где достоверное угнетение ХЛ вызывал хлорофиллин в концентрациях выше 1.5 мкмоль/л [4].

Проиллюстрированное на рис. 3 угнетение под действием Cu-Ch ХЛ, сопровождающей индуцированное реакцией Фентона ПОЛ, можно считать доказательством того, что Cu-Ch способен ингибировать ПОЛ, вызванное атакой гидроксильных и пероксильных радикалов на молекулы липидов. А так как именно эти реакции обуславливают метаболизм липидных радиотоксинов, имеющий место при действии ионизирующего излучения на организм, можно говорить о том, что в настоящей работе получены доказательства того, что в механизме радиозащитного действия

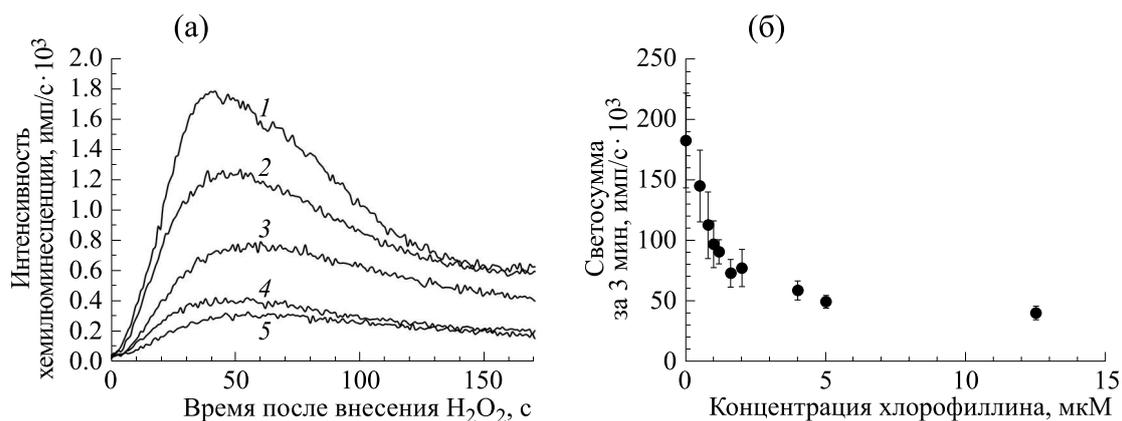


Рис. 3. Влияние хлорофиллина на интенсивность ХЛ, сопровождающей липидную пероксидацию, индуцированную 250 мкМ H_2O_2 в системе: 250 мкМ Fe^{2+} , 1400 мкМ дилинолеилфосфатидной кислоты, хлорофиллин различных концентраций: (а) – кривые ХЛ при отсутствии Cu-Ch (кривая 1) и в присутствии Cu-Ch в концентрациях 0.5 мкМ (кривая 2), 1 мкМ (кривая 3), 5 мкМ (кривая 4), 12.5 мкМ (кривая 5); (б) – значения светосуммы системы за первые 3 мин реакции при различных концентрациях Cu-Ch.

препаратов на основе хлорофилла важную роль играет подавление реакций ПОЛ, вызванных действием радиации на клетки.

Необходимо указать, что при анализе результатов экспериментов по регистрации ХЛ на системах, в которых присутствуют хлорофилл или его производные, необходимо учитывать, что хлорофилл может проявлять свойства усилителя ХЛ [15]. Однако в случае настоящего исследования данный факт не вызывает беспокойства: возможное усиление интенсивности ХЛ под действием Cu-Ch могло искажать результаты лишь в пользу предположения, что Cu-Ch не является ингибитором ПОЛ. А так как было показано дозозависимое снижение интенсивности ХЛ в пробах, содержащих Cu-Ch, указанная авторами [15] способность хлорофилла усиливать ХЛ не служит основанием для сомнений в выводах, полученных при анализе данных на рис. 1. Ведь даже если она и исказила результат, то только в сторону мнимого увеличения интенсивности свечения, которое трактуется как повышение (а не снижение) интенсивности ПОЛ. А поскольку интенсивность ХЛ в пробах, содержащих Cu-Ch, ниже, чем в контроле, интенсивность ПОЛ в них тоже ниже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, согласно данным, полученным методом регистрации хемилуминесценции, можно говорить о том, что медный хлорофиллин ингибирует липидную пероксидацию, запускаемую гидроксильными и пероксильными радикалами. А так как данные вещества являются в конечном счете основными продуктами радиолитического распада воды, можно сделать вывод, что аналогичными свойствами хлорофиллин может обладать и в жи-

вых клетках, подвергнутых радиационному воздействию. Данный результат подтверждает выдвинутое ранее предположение о том, что в механизме радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла важную роль играет подавление реакций липидной пероксидации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор настоящей работы выражает благодарность и признательность М.А. Кувшиновой, технику лаборатории Фармакологии противолучевых средств ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, за проведение ряда измерений интенсивности хемилуминесценции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор настоящей статьи заявляет, что не имеет конфликта интересов касательно материалов, представленных в работе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве экспериментальных объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ромодин Л. А. и Лысенко Н. П. Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла. *Биофизика*, **67** (1), 96–104 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010094
2. Kumar S. S., Shankar B., and Sainis K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1672** (2), 100–111 (2004). DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002
3. Поздеев А. В. *Разработка радиозащитных средств на основе веществ растительного и минерального происхождения*. Дисс. ... докт. биол. наук по специальности 03.01.01 – Радиобиология (Федер. центр токсиколог., радиац. и биол. безопасности, Кострома, 2015).
4. Ромодин Л. А. Угнетение хлорофиллином хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома с с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию. *Изв. Саратовского ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*, **20** (4), 427–432 (2020). DOI: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-427-432
5. Ромодин Л. А., Лысенко Н. П. и Пашовкин Т. Н. Использование хинолизидиновых производных кумарина при изучении механизмов действия комплекса цитохрома с с кардиолипином. *Биол. мембраны*, **39** (3), 224–234. (2022). DOI: 10.31857/S0233475522020062
6. Владимиров Ю. А. и Арчаков А. И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
7. Кузин А. М. *Структурно-метаболическая теория в радиобиологии* (Наука, М., 1986).
8. Лысенко Н. П., Пак В. В., Рогожина Л. В. и Кусурова З. Г. *Радиобиология: учебник*, под ред. Н. П. Лысенко и В. В. Пака, 5-е изд. (Изд-во «Лань», Санкт-Петербург, 2019).
9. Иванова И. П., Трофимова С. В. и Пискарёв И. М. Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, - математическое моделирование процесса; особенности, параметры и условия применения для биомедицинских исследований. *Современные технологии в медицине*, **6** (4), 14–25 (2014).
10. Бурлакова Е. Б., Аткарская М. В., Фаткуллина Л. Д. и Андреев С. Г. Радиационно-индуцированные изменения структурного состояния мембран клеток крови человека. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **54** (2), 162–168. (2014). DOI: 10.7868/S0869803114020040
11. Владимиров Ю. А. и Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биол. химии*, **49**, 341–388 (2009).
12. Пискарёв И. М. и Иванова И. П. Оценка окислительной и антиоксидантной способности биологических субстратов по хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона. *Современные технологии в медицине*, **8** (3), 16–26 (2016). DOI: 10.17691/stm2016.8.3.02
13. Ромодин Л. А. Хемилюминесценция в исследовании свободнорадикальных реакций. Часть 1. *Acta Naturae*, **13** (3), 90–100 (2021). DOI: 10.32607/acta-naturae.10912
14. Закотеев Ю. А. *Хемилюминесценция. Принципы и методики регистрации, оборудование, задачи*. (Москва, 2015). <http://louvaah-mar.narod.ru/doc/chemilumi-zakoteev.pdf>
15. Sharov V. S., Briviba K., and Sies H. Assessment of the C-525 laser dye as a chemiluminescence sensitizer for lipid peroxidation in biological membranes: A comparison with chlorophyll- α . *Free Radic. Biol. Med.*, **21** (6), 833–843 (1996).

Chlorophyllin Inhibits Lipid Peroxidation Triggered by the Fenton Reaction**L.A. Romodin***

*State Scientific Center of the Russian Federation – Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia

The Fenton reaction was used to model a system in which particles similar to those formed during water radiolysis are created. A method of registering the chemiluminescence was applied to the analysis of the chlorophyllin-induced suppression of reactions caused by hydroxyl radicals. It has been shown that sodium copper chlorophyllin dose-dependently inhibits the chemiluminescence which accompanies the Fenton-mediated oxidation of phosphatidic acid. This leads us to conclude that copper chlorophyllin can inhibit the metabolism of lipid radiotoxins, also known as lipid peroxidation, caused by the attack of water radiolysis products to lipid molecules.

Keywords: Fenton reaction, hydroxyl radical, hydroperoxyl radical, chlorophyll, chlorophyllin, antioxidant, lipid peroxidation, chemiluminescence