

СРАВНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ПО УСИЛЕНИЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ОТВЕТА ПРОИЗВОДНЫМИ ФЕНОЛА С КВАНТОВО- ХИМИЧЕСКИМИ РАСЧЁТАМИ

Шубина В. С., Наумов А. А., Шаталин Ю. В., Рыжков П. А.,
Поцелуева М. М.

(Россия, Пущино)

Проведены исследования по усилению чувствительности люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) производными фенольного ряда в модельной системе, содержащей люминол (2.8×10^{-5} М), пероксидазу хрена (0.02 мг/мл) и перекись водорода (2.9×10^{-5} М). В присутствии производных фенола (10^{-3} - 10^{-7} М) интенсивность ХЛ возрастает в ряду: фенол (3–7%) > о-фторфенол (10–12%) > п-фторфенол (20–25%) > м-фторфенол (70–73%) > п-иодфенол (120–130%). Полуэмпирическим методом Хартри-Фока рассчитаны значения энергий образования фенолят-радикалов. Установлено, что разница энергий ($\Delta E_{\text{радикал}} - \Delta E_{\text{анион}}$) возрастает в ряду: фенол (47.36) > о-фторфенол (52.04) > п-фторфенол (52.54) > м-фторфенол (54.92) > п-иодфенол (55.02) > люминол (58.85) > п-нитрофенол (79.17) > 2,4-динитрофенол (110.65). Для ряда соединений, ΔE которых превышает значение, полученное для люминола, наблюдается тушение хемилюминесцентного ответа. Квантово-химические расчеты были полностью подтверждены экспериментальными данными.

Введение. В последние годы метод измерения как собственной, так и усиленной люминолом или люцигенином хемилюминесценции находит широкое применение, в первую очередь, именно при изучении клеток фагоцитов: гранулоцитов (полиморфноядерные лейкоциты) крови, моноцитов и тканевых макрофагов. Свечение резко возрастает при стимуляции дыхатель-

ного взрыва различными активаторами (стимулами). Регистрация РФК основана на переносе электрона пероксидазой с молекулы перекиси на люминол, который переходя в возбужденное состояние, превращается в аминифталат и испускает кванты света, регистрируемые при 425 нм.

Повышение чувствительности ХЛ-метода в настоящий момент идет по пути разработки сверхчувствительных хемилюминесцентных зондов, механизм действия которых основан на переносе энергии от донора (люминол) к акцептору (флуоресцентный зонд).

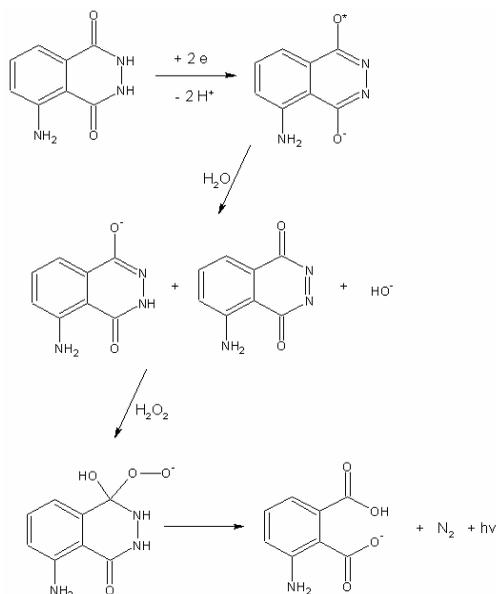


Схема 1. Окисление люминола в системе люминол-пероксидаза-перекись водорода

рость лимитирующей, стадии [3]. Как можно предположить, время жизни для энхансеров, таких как 4-иодфенол, 6-гидроксибензотиазол и некоторых других [2,4,1], в радикальной форме намного выше времени жизни для пероксид радикала [8], гидроксильного радикала ($2 \times 10^{-9} - 8 \times 10^{-9}$ с) [6,7] и супероксид аниона (10^{-6} с) [5], при этом увеличивается их длина свободного

Другой тип усиления основан на использовании энхансеров ХЛ-ответа, которые образуют более устойчивые радикалы при взаимодействии с РФК и при этом легко взаимодействуют с люминолом. Усиление по этому пути отражает переход люминола из молекулярной формы в анион-радикальную. На схеме 1 этот

путь отображен в виде первой, скорости

пробега, и как следствие увеличивается вероятность переноса электрона на люминол.

Квантово-химические расчёты производных фенола позволяют рассчитать стабильность фенолят-радикалов, которая с большой вероятностью будет коррелировать со свойствами усиления хемилюминесценции. Таким образом, была поставлена задача сопоставить данные квантово-химических расчётов с экспериментальными данными по усилению хемилюминесценции в модельной системе.

Объекты исследования. Модельная система (TRIS буфер (pH = 8); $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола; 10^{-6} моль/л H_2O_2 ; 5 ед./мл пероксидазы) регистрации РФК (реактивных форм кислорода); энхансеры (*p*-йодфенол (ПИФ), *p*-фторфенол (ПФФ), *m*-фторфенол (МФФ), *o*-фторфенол (ОФФ), *p*-нитрофенол, 2,4-динитрофенол, 2,4,6-тринитрофенол).

Результаты и обсуждения. Исследовалась модельная система, генерирующая реактивные формы кислорода, содержащая люминол (2.8×10^{-5} М), пероксидазу хрена (0.02 мг/мл) и перекись водорода (2.9×10^{-5} М). В данной системе осуществляется перенос электрона с перекиси на молекулу люминола под действием пероксидазы. Эта реакция характеризуется большой зависимостью от присутствия дополнительных компонентов, которые могут оказывать как ингибирующее так и усиливающее действие. Нами было исследована способность ряда соединений усиливать хемилюминесценцию люминола. Был выбран ряд галогенфенолов, которые вводились в систему непосредственно до запуска реакции и в момент достижения максимума. Схема эксперимента выглядела следующим образом. В ячейку хемилюминометра вводилось 470 мкл среды регистрации (0.9% NaCl, 5 mM TRIS, pH = 8), 10 мкл люминола ($2.5 \cdot 10^{-3}$ М), 10 мкл пероксидазы хрена (250 ед./мл). Реакция запускалась добавкой 10 мкл пероксида водорода (5×10^{-3} М) [9]. В качестве критерия было выбрано отношение тангенсов угла наклона в кинетических кривых, в присутствии и отсутствии энхансера. Данные представлены графически на рис. 1 в процентах от контроля без добавления энхансера.



Рис. 1. Влияние энхансеров на скорость хемилюминесценции. Обозначения: 1 — *o*-хлорфенол; 2 — *p*-хлорфенол; 3 — *o*-иодфенол; 4 — *m*-хлорфенол; 5 — *o*-бромфенол; 6 — *p*-бромфенол; 7 — *m*-иодфенол; 8 — *m*-бромфенол

Как оказалось, наиболее эффективными энхансерами ХЛ-ответа из рассмотренных соединений являются 4-иодфенол и 3-фторфенол, которые усиливали ХЛ в 4.5; 3.5 раза соответственно. Незамещённый фенол в различных концентрациях не повлиял на хемилюминесценцию в модельной системе.

При подборе энхансеров необходимо учитывать время жизни образующихся из них радикалов, которое должно быть по возможности более длительным, но при этом не превышать время жизни возбуждённой формы люминола.

Для расчёта энергий образования радикалов мы использовали программный пакет HyperChem 7.0. Расчет проводили полуэмпирическим методом PM3 (табл. 1), используя в качестве приближения неограниченный метод Хартри–Фока [10].

Учитывая энергию образования радикала из соответствующего аниона, можно провести корреляцию между структурой

молекулы энхансера и её способностью усиливать ХЛ ответ. Исходя из экспериментальных данных, мы выдвинули гипотезу о том, что другие галогенфенолы, возможно, так же усиливают хемиллюминесцентный ответ (на рисунке 1 изображены в виде треугольников). Тем не менее, при приближении разности энергий между анионной и радикальной формой энхансера и люминола усиление хемиллюминесценции будет наблюдаться лишь до определённой величины, затем, возможно, происходит тушение ХЛ-ответа с перегибом в точке, соответствующей люминолу.

Таблица 1. Квантово-химические расчёты энергий образования модельных соединений

Модельные соединения	$E_{\text{моль}}$ ккал/моль	$E_{\text{рад}}$ ккал/моль	$E_{\text{ан}}$ ккал/моль	$E_{\text{рад}} - E_{\text{ан}}$ ккал/моль	Усиление ХЛ-ответа в модельной системе, %
H ₂ O	-7492.69	-7082.83	-7103.17	20.34	
H ₂ O ₂	-4212.10	-3820.40	-3841.80	21.39	
фенол	-5291.20	-4912.70	-4960.00	47.37	101
<i>o</i> -хлорфенол	-2241.80	-1863.70	-1915.70	52.04	
<i>o</i> -фторфенол	-5089.00	-4711.20	-4763.60	52.49	115
<i>n</i> -фторфенол	-5089.40	-4711.60	-4764.20	52.54	225
<i>n</i> -хлорфенол	-2242.00	-1864.20	-1917.20	53.01	
<i>o</i> -иодфенол	-1585.80	-1207.80	-1261.60	53.77	
<i>m</i> -хлорфенол	-2242.10	-1863.10	-1917.00	53.89	
<i>m</i> -фторфенол	-5089.80	-4710.40	-4765.40	54.92	330
<i>n</i> -иодфенол	-1590.70	-1211.90	-1266.90	55.02	385
<i>o</i> -бромфенол	-3085.70	-2705.90	-2761.00	55.09	
<i>n</i> -бромфенол	-3086.70	-2707.60	-2763.30	55.73	
<i>m</i> -иодфенол	-1590.60	-1211.90	-1267.80	55.93	
<i>m</i> -бромфенол	-3086.70	-2707.60	-2763.90	56.27	
люминол	-9097.60	-8417.60	-8358.70	-58.85	

Замена галогенов на нитрогруппу (4-нитрофенол) или введение несколько галогенов в бензольное кольцо приводит к инги-

бированию хемилюминесценции, что видно на рисунке 2. При этом разница энергий для ингибиторов хемилюминесценции ($E_{\text{радикала}} - E_{\text{аниона}}$) превышает значение 58.85 ккал/моль (значение для люминола). Это говорит о том, что образующийся радикал может обрывать цепи на стадии образования анион-радикала люминола, и квант света не высвечивается (табл. 2).

Таблица 2. Квантово-химические расчёты энергий образования тушителей хемилюминесценции

Модельные соединения	$E_{\text{рад}}$, ккал/моль	$E_{\text{ан}}$, ккал/моль	$E_{\text{рад}} - E_{\text{ан}}$, ккал/моль	Тушение ХЛ-ответа в Модельной системе, %
Люминол	-8417.60	-8358.70	-58.85	
2,6-дифторфенол	-4498.40	-4566.50	68.13	
2,6-диiodфенол	-7492.00	-7561.80	69.87	
3,4-дифторфенол	-4498.40	-4568.50	70.05	
3,5-дифторфенол	-4496.10	-4569.90	73.77	
2,4,6-триiodфенол	-3791.00	-3865.90	74.96	
пентахлорфенол	-9651.80	-9729.60	77.75	80
пентаiodфенол	-6361.40	-6440.40	78.95	
4-нитрофенол	-1776.60	-1855.80	79.17	82
пентафторфенол	-3887.30	-3974.40	87.10	
2,4-динитрофенол	-8626.40	-8737.00	110.63	97
2,4,6-тринитрофенол	-5483.20	-5613.20	130.01	98

Исходя из полученных данных по тушению хемилюминесцентного ответа для нитрофенолов и пентахлорфенола, можно показать тенденцию, представленную на рисунке 2 для ди- и тригалогенфенолов, величина $E_{\text{радикала}} - E_{\text{аниона}}$ которых превышает значение 58.85 ккал/моль, соответствующая люминолу. Чем больше величина ΔE тушителя, тем более сильное ингибирование ХЛ-ответа наблюдается. На рисунке представлено сравнение экспериментальных данных по тушению хемилюминесценции с расчётными значениями ΔE (белые ромбы), а так же возможное расположение других тушителей исходя из предложенной гипотезы (красные кружки).

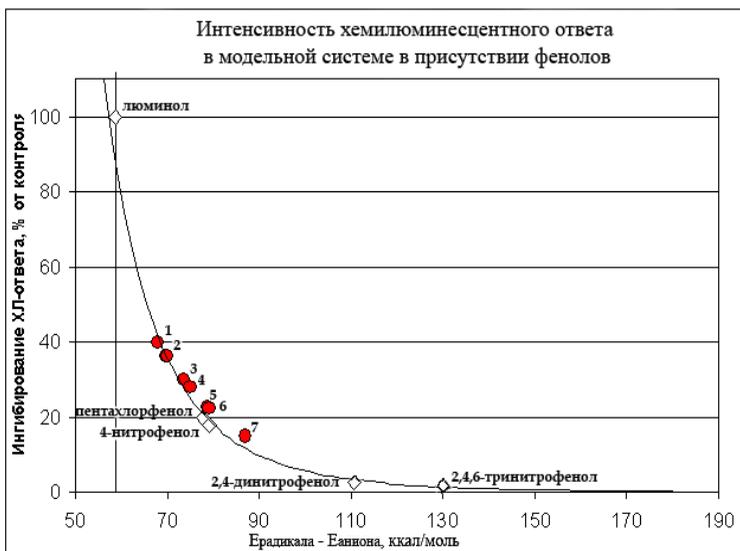


Рис. 2. Ингибирование хемиллюминесцентного ответа в присутствии нитрофенолов, ди- и тригалогенфенолов. Обозначения: 1 — 2,6-дифторфенол; 2 — 2,6-диодфенол; 3 — 3,4-дифторфенол; 4 — 3,5-дифторфенол; 5 — 2,4,6-пентафторфенол; 6 — пентаиодфенол; 7 — пентафторфенол

Выводы. В результате работы было исследовано усиление интенсивности хемиллюминесценции системы люминол-пероксидаза-перекись водорода в присутствии фторфенолов и 4-иодфенола. Данные по усилению ХЛ коррелировали с расчётными данными энергии образования радикалов, полученные квантово-химическим методом. Вследствие чего выдвинуто предположение о возможном усилении ХЛ-ответа другими галогенфенолами.

Введение более одного атома галогена в фенольное кольцо или введение сильного электрон-акцепторного заместителя (нитрогруппа) привело к тушению ХЛ. По данным расчётов энергия образования таких фенолят-радикалов превышает значение ΔE для люминола. По нашим предположениям, зависимость усиления-тушения системы люминол-пероксидаза-перекись водорода от энергии образования радикалов имеет

максимум, расположенный в районе 58 ккал/моль (энергия, расчитанная для анион-радикала люминола).

Список литературы:

1. Thorpe G.H.G., Kricka L.J., Gillespie E., Moseley S., Amess R., Baggett N., Whitehead T. P. Enhancement of the horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of cyclic diacyl hydrazides by 6-hydroxybenzothiazoles // *Analytical biochemistry*. 1985. V.145. P.96–100.
2. Kapeluich Y.L., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M. Enhanced chemiluminescence reaction applied to the study of horseradish peroxidase stability in the course of p-iodophenol oxidation // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1997. V.12.N.6. P.299–308.
3. Van Dyke K., Castranova V. Cellular chemiluminescence. 1987. V.1. P.101.
4. Navas Diaz A., Garcia Sanchez F., Gonzalez Garcia J.A. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminal-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies // *Analytica Chimica Acta*. 1996. V.327. P.161–165.
5. Prodczaxy J.J., Wei. R. Reduction of iodinitrotetrazolium violet by superoxide radicals // *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 1988. V.150. P.1294–1301.
6. Roots R., Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells // *Radiat. Res.* 1975. V.64. P.306–320.
7. Vanasbeck B.S. Involvement of oxygen radicals in blood cells in the pathogenesis of ARDS by endotoxin and hyperoxia // *Appl. Cardiopulm. And Pathophysiol.* 1991. V.4. P.127–138.
8. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Менщикова Е.Б. Окислительный стресс. — М: МАИК “Наука/Интерпериодика”, 2001. 343с.
9. Ковалёва Е.В., Наумов А.А., Шаталин Ю.В., Григорьева Е.Е., Рыжков П.А., Поцелуева М.М. Влияние энхансеров на интенсивность хемилюминесцентного ответа в модельной и фагоцит-содержащей системах. 8-я международная пушинская школа-конференция молодых учёных “Биология — наука XXI века”. Сборник тезисов 17–21 мая 2004. С.99.

10. Тарабанько В.Е., Варганов С.А., Петухов Д.В., Аврамов П.В., Иванченко Н.М. Исследование кислотности радикальных интермедиатов окисления лигнина квантово-химическими методами // Химия растительного сырья. 1998. Т.3. С.2–11.

COMPARISON OF EXPERIMENTAL DATA ON PHENOL-INDUCED ENHANCEMENT OF THE CHEMILUMINESCENCE RESPONSE WITH THE QUANTUM-CHEMICAL CALCULATIONS

Shubina V. S., Naumov A. A., Shatalin Yu. V., Ryzhkov P. A., Potselueva M. M.

(Russia, Pushchino)

The present our study of enhancement of the sensitivity of luminol-dependent chemiluminescence with phenol derivatives in a model system containing luminol (2.8×10^{-5} M), horse-radish peroxidase (0.02 mg/ml) and hydrogen peroxide (2.9×10^{-5} M). In the presence of phenol derivatives (10^{-3} – 10^{-7} M) the intensity of the chemiluminescence response increased in the series: phenol (3–7%) > fluorophenol (10–12%) > fluorophenol (20–25%) > fluorophenol (70–73%) > iodophenol (120–130%). The energy difference ($\Delta E_{\text{radical}} - \Delta E_{\text{anion}}$) was shown to increase in the series: phenol (47.36) > 2-fluorophenol (52.04) > 4-fluorophenol (52.54) > 3-fluorophenol (54.92) > 4-iodophenol (55.02) > luminol (58.85) > 4-nitrophenol (79.17) > 2,4-dinitrophenol (110.65). For a number of compounds whose energy difference exceeded the value obtained for luminol, a quenching of the chemiluminescence response was observed. The quantum-chemical calculations were completely confirmed by the experimental data.