

## КИНЕТИЧЕСКАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИЙ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

© 2011 г. Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина, Д.Ю. Измайлов

Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Воробьевы горы

E-mail: yuvlad@mail.ru

Поступила в редакцию 09.06.11 г.

Рассмотрены принципы анализа кинетики сложных систем реакций с участием радикалов, основанного на сравнении кинетических кривых хемилюминесценции в присутствии хемилюминесцентных проб и физического активатора хемилюминесценции кумарина С-525 с данными математического моделирования кинетики. Данный подход использован для расшифровки механизма разветвленных цепных реакций липидной пероксидации в биологических и фосфолипидных мембранах, механизма действия и оценки активности антиоксидантов и при изучении реакции образования радикалов в комплексе цитохрома с с кардиолипином, являющейся ключевой для запуска апоптоза.

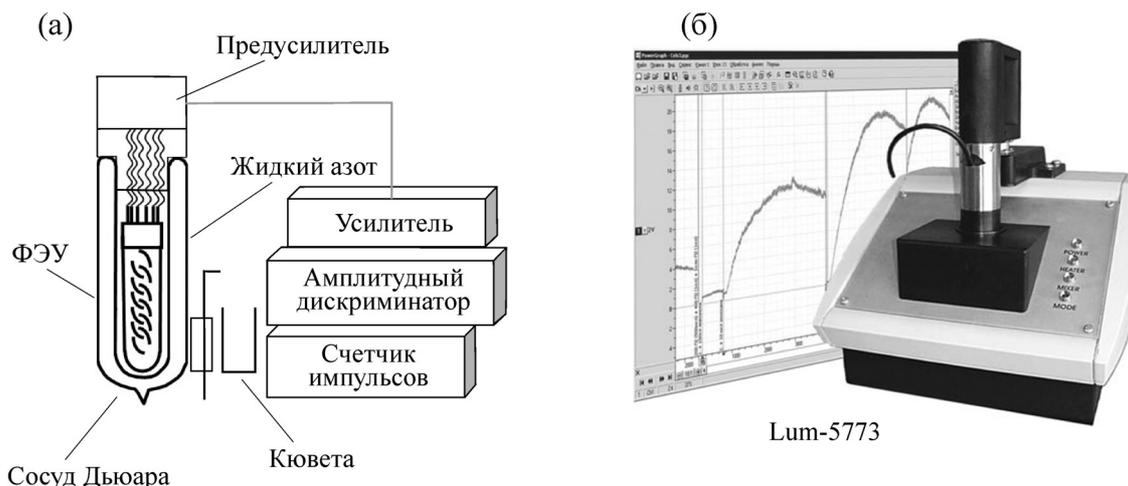
*Ключевые слова:* свободные радикалы, хемилюминесценция, активаторы хемилюминесценции, перекисное окисление липидов.

Свободные радикалы принимают непосредственное участие в регуляции внутриклеточных процессов, а также в повреждении клеточных структур и запуске запрограммированной смерти клеток, апоптоза. Изучение свободных радикалов стало возможным благодаря разработке биохимических (метод маркеров и ингибиторный анализ), а также биофизических методов: электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и хемилюминесценции. Преимущество метода ЭПР заключается в том, что он позволяет не только обнаруживать радикалы и судить об их концентрации в исследуемом образце, но зачастую судить и о природе радикала по форме сигнала ЭПР. Однако метод ЭПР позволяет обнаруживать преимущественно стабильные радикалы, тогда как чувствительность метода хемилюминесценции выше в присутствии именно малоустойчивых, химически активных радикалов [1].

Применение метода хемилюминесценции к изучению свободных радикалов началось, вероятно, с обнаружения собственной хемилюминесценции животных клеток и тканей, которое получило в свое время название «сверхслабого свечения» [2]. Первоначально эта хемилюминесценция не была четко ассоциирована с реакциями свободных радикалов, хотя довольно

скоро благодаря работам Б.Н. Тарусова и сотр. [3–5] и нашим [6–9] стало ясно, что сверхслабое свечение связано с реакциями перекисного окисления липидов, идущего с участием липидных радикалов. Непосредственная связь собственной хемилюминесценции с реакциями радикалов была показана при изучении нестационарной кинетики хемилюминесценции в системе, состоящей из суспензии митохондрий и добавленных к ней ионов  $Fe^{2+}$  [10–12]. Вскоре предложенная схема цепных реакций окисления липидов в митохондриальных мембранах была подтверждена с помощью математического моделирования кинетики хемилюминесценции [13]. Дальнейший прогресс в исследовании свободнорадикальных реакций методом кинетической хемилюминесценции был связан, прежде всего, с разработкой приборов, позволяющих измерять кинетику очень слабой хемилюминесценции биологических объектов в условиях термостатирования, постоянной аэрации и возможности введения реагентов по ходу эксперимента. Первый прибор такого рода, основанный на использовании фотоумножителя, охлаждаемого жидким азотом, и работающий в режиме счета фотонов, был разработан нами в 1959 г. [12] (рис. 1а). Затем последовала большая серия работ как в нашей стране, так и за рубежом, в которых применялась аналогичная техника, изготовленная в лабораториях. В настоящее время выпускается много хороших хемилюминомет-

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, АБАП – 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан).



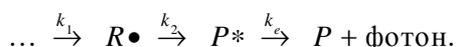
**Рис. 1.** Приборы для измерения хемилюминесценции. (а) – Установка для измерения сверхслабых свечений: фотоумножитель, охлаждаемый жидким азотом и работающий в режиме счёта фотонов [2]. (б) – Современный лабораторный хемилюминометр Lum-5773 (ООО «ДИСофт» Москва), разработанный на кафедре медицинской биофизики МГУ.

ров, один из которых разработан и используется в нашей лаборатории (рис. 1б).

## ПРИНЦИПЫ МЕТОДА

Принципиальное отличие метода хемилюминесценции от других аналитических методов, таких как ЭПР, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, хроматография и т. д., заключается в том, что последние регистрируют *концентрацию вещества*, тогда как интенсивность хемилюминесценции говорит о *скорости реакции*, сопровождающейся свечением.

В биологических системах радикалы существуют в качестве промежуточных продуктов, которые, образуясь в некоторой реакции 1, тотчас исчезают в последующих реакциях, одна из которых может сопровождаться высвечиванием фотона:



Очевидно, что интенсивность свечения  $I_{CL}$  пропорциональна скорости последней реакции  $v_e = k_e[P^*]$ , которую будем называть *хемилюминесцентной*.

$$I_{CL} = K \cdot k_e [P^*], \quad (1)$$

где  $K$  – коэффициент, характеризующий чувствительность прибора к излучению с данным квантовым выходом и спектром. Из-за высокой скорости реакций превращения радикалов  $[R\bullet]$  в системе мгновенно устанавливается стационарное состояние, при котором скорости всех последовательных реакций одинаковы. Отсюда яс-

но, что *интенсивность хемилюминесценции пропорциональна скорости образования радикалов  $v_1$* .

$$I_{CL} = K \cdot k_e [P^*] = K \cdot v_1. \quad (2)$$

Заметим, что метод хемилюминесценции позволяет оценивать также и стационарную концентрацию радикалов  $[R\bullet]$  в каждый данный момент времени, поскольку

$$I_{CL} = K \cdot v_1 = K \cdot v_2 = K \cdot k_2 [R\bullet]. \quad (3)$$

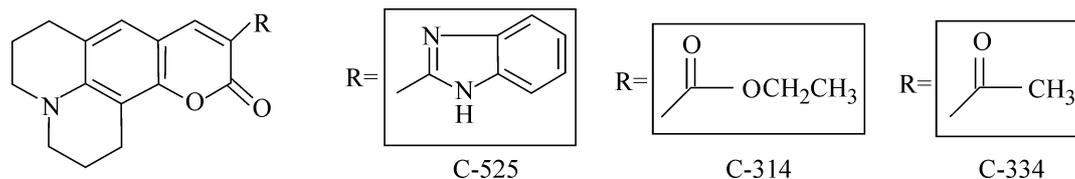
Стационарная концентрация радикалов, как видно из последнего уравнения, снижается при увеличении константы скорости  $k_2$ :

$$[R\bullet] = v_1 / k_2. \quad (4)$$

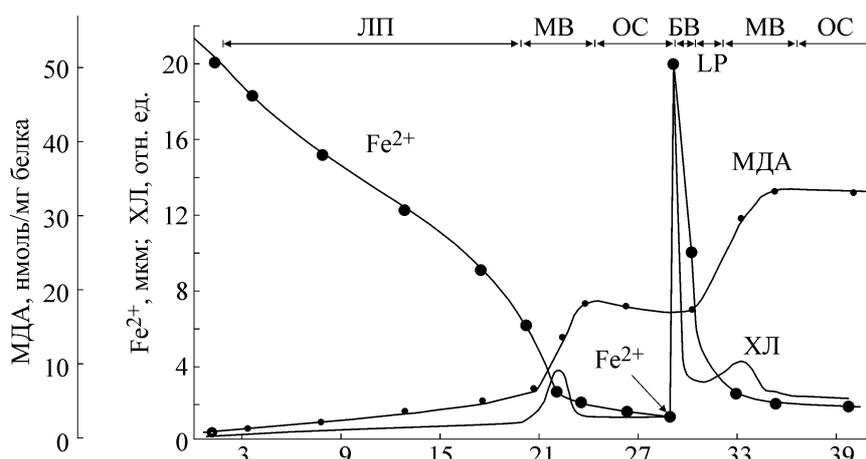
Иначе говоря, чем выше реакционная способность радикалов  $k_2$ , тем ниже стационарная концентрация радикалов в системе, где они постоянно образуются (т.е. при той же  $v_1$ ). Поэтому обычные аналитические методы не в состоянии регистрировать радикалы из-за высоких скоростей их исчезновения и низкой стационарной концентрации. К методу хемилюминесценции это не относится, так как интенсивность зависит только от скорости образования радикалов  $v_1$  и не зависит от константы скорости  $k_2$  (подробнее см. [1]).

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АКТИВАТОРОВ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Активаторы хемилюминесценции – это специальные соединения, используемые для обнаружения радикалов, реакции которых хотя и



**Рис. 2.** Хинолизиновые кумарины – активаторы хемилюминесценции. Наиболее активен C-525 [46]: хемилюминесценцию при липидной пероксидации он усиливает больше чем в 1500 раз [47].



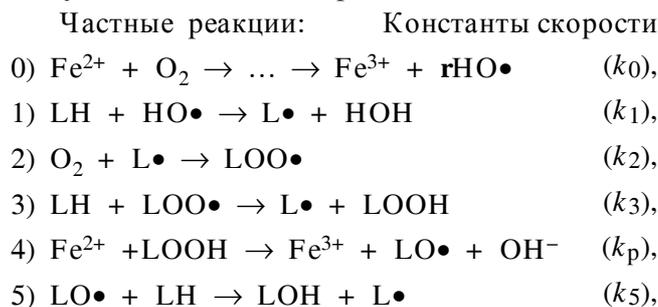
**Рис. 3.** Кинетика изменения концентрации ионов железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ), продукта липидной пероксидации (МДА) и хемилюминесценции (ХЛ) в суспензии митохондрий, к которым добавили ионы  $\text{Fe}^{2+}$  [11].

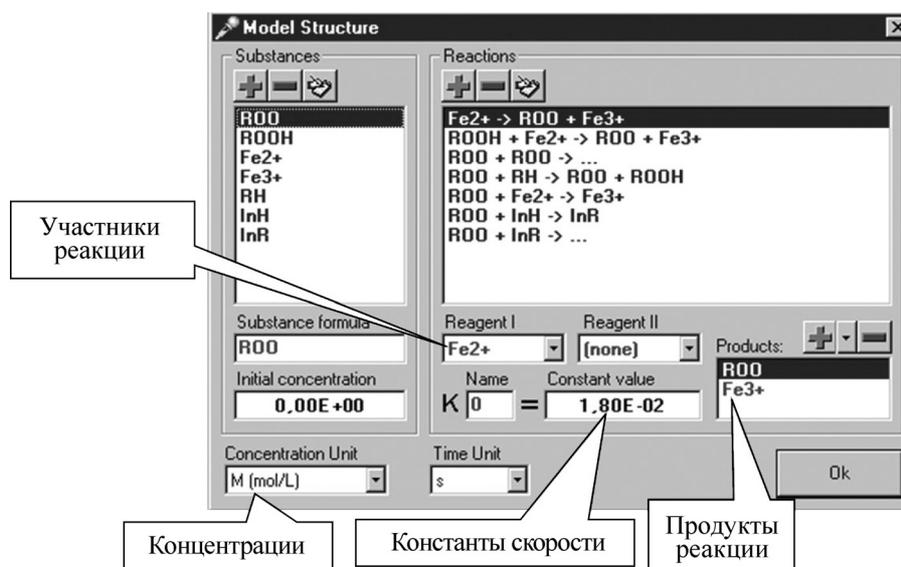
дают свечение, но слишком слабое и неспецифическое именно для данного радикала. В работе [14] предложено делить активаторы на *хемилюминесцентные зонды*, т.е. такие соединения, которые участвуют в реакциях с радикалами, образуя в результате продукты в электронно-возбужденном состоянии, и физические, которые в реакциях не участвуют, но повышают общий квантовый выход хемилюминесценции. Механизм реакций наиболее известных хемилюминесцентных зондов люминола и люцигенина, а также механизм усиления хемилюминесценции при перекисном окислении липидов физическими активаторами, производными кумарина (рис. 2) рассмотрен в обзоре [1]. При исследовании реакций с участием радикалов C-525 используется для обнаружения пероксильных радикалов липидов  $\text{LOO}\cdot$ , люцигенин – радикалов супероксида  $\cdot\text{O}_2^-$ , а люминол, в зависимости от используемой системы, – для измерения уровня гидроксильного, супероксидного радикалов, пероксида водорода, гипохлорита или промежуточных продуктов в каталитическом цикле пероксидаз. В силу весьма низкой интенсивности собственной хемилюминесценции живых клеток и тканей [2,15–18], для изучения свободнорадикальных реакций чаще все-

го используется именно активированная хемилюминесценция.

#### АНАЛИЗ КИНЕТИКИ И МЕХАНИЗМА РЕАКЦИЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Перекисное окисление липидов – это цепная реакция, характерная для окисления большинства органических соединений кислородом воздуха. В системах, содержащих биологические мембраны, например в суспензии митохондрий, перекисное окисление может быть вызвано добавлением солей двухвалентного железа. При этом возникает свечение с довольно сложной кинетикой (см. рис. 3). Даже качественное рассмотрение полученных данных позволило предположить, что в процессе участвуют как минимум девять частных реакций [19–21]:





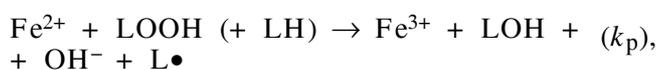
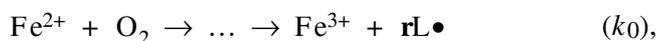
**Рис. 4.** Одно из окон программы «Кинетика». Вводятся обозначения реагентов и продуктов, их концентрации, схема реакций, константы скоростей реакций, а также параметры, необходимые для расчетов: величина временного шага и т.д. Кривые зависимости от времени всех концентраций и скоростей частных реакций, а также рассчитанная кривая хемилюминесценции выводятся на экран и могут быть скопированы в форме электронной таблицы для дальнейшей обработки. На экране можно отобразить также экспериментальные кривые для визуального сравнения с расчетными.

- 6)  $\text{LOO}\bullet + \text{LOO}\bullet \rightarrow \text{продукты} + \text{фотон}$  ( $k_6$ ),  $\text{L}\bullet + \text{O}_2 (+ \text{LH}) \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\bullet$  ( $k_2$ ),  
 7)  $\text{InH} + \text{L}\bullet \rightarrow \text{LH} + \text{In}\bullet$  ( $k_7$ ),  $\text{Fe}^{2+} + \text{L}\bullet + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{LH}$  ( $k_9$ ),  
 8)  $\text{In}\bullet + \text{L}\bullet \rightarrow \text{продукты}$  ( $k_8$ ),  $\text{LOO}\bullet + \text{LOO}\bullet \rightarrow \text{L=O} + \text{LOH} + \text{фотон}$  ( $k_6$ ).  
 9)  $\text{Fe}^{2+} + \text{L}\bullet + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{LH}$  ( $k_9$ ).

Уже вскоре после получения кривых типа приведенной на рис. 3 было осуществлено математическое моделирование кинетики [13], впоследствии повторенное с существенными улучшениями [22]. В конечном итоге в нашей группе была разработана удобная компьютерная программа «Кинетика» для математического моделирования кинетики сложных систем реакций (рис. 4). Исследователь записывает схему реакций, вносит начальные концентрации реагентов и предполагаемые константы скоростей реакций.

Алгоритм работы сводится к следующему.

*Этап 1.* Прежде всего, выбирается минимальная система реакций, описывающая процесс. На первом этапе это было сделано путем замены всех параллельно идущих реакций одной, которая по разным соображениям должна протекать быстрее остальных, и всех последовательных реакций одной, которая протекает медленнее остальных. В результате было выбрано пять реакций [21]



Заметим, что из уравнений при этом были исключены продукты, не участвующие в реакциях, или те, концентрации которых постоянны, поскольку они не влияют на общую кинетику.

*Этап 2.* На основании схемы реакций и закона действующих масс производится расчет скоростей всех частных реакций. Это можно сделать в том случае, если в каждый данный момент известны концентрации реагентов и константы скоростей реакций:

$$\begin{aligned} v_0 &= k_0 [\text{Fe}^{2+}]_0 [\text{O}_2], \\ v_p &= k_p [\text{Fe}^{2+}]_0 [\text{LOOH}], \\ v_2 &= k_2 [\text{L}\bullet]_0 [\text{O}_2], \\ v_9 &= k_9 [\text{Fe}^{2+}]_0 [\text{L}\bullet], \\ v_6 &= k_6 [\text{LOO}\bullet]_0^2. \end{aligned}$$

*Этап 3.* Рассчитываются скорости увеличения концентрации всех участников реакции. Например:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{LOOH}]}{dt} &= v_2 - v_p, \quad \frac{d[\text{L}\bullet]}{dt} = v_p + v_0 - v_9, \\ \frac{d[\text{Fe}^{2+}]}{dt} &= -v_0 - v_p - v_9. \end{aligned}$$

Полученная система дифференциальных уравнений решается методом численного ин-

тегрирования. Компьютерная программа строит график зависимости от времени концентраций всех реагентов, а также кривую кинетики хемилюминесценции, рассчитанную по уравнению:

$$I_{CL} = A[LOO\bullet]^2, \quad (3)$$

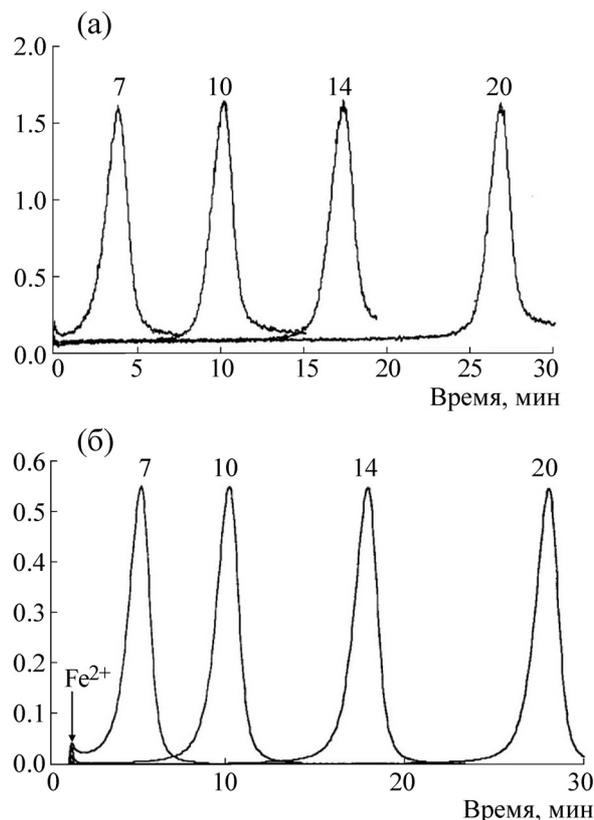
где  $A$  – постоянная, зависящая от константы скорости  $k_6$ , квантового выхода хемилюминесценции и чувствительности аппаратуры.

После расчета кинетических кривых, в том числе расчета и построения кривой хемилюминесценции, данные расчета и экспериментальные данные сравниваются между собой и производится уточнение той или иной константы, а затем расчет повторяют до удовлетворительного совпадения расчетной и экспериментальной кривой хемилюминесценции. Этот метод оказывается плодотворным, если сначала производятся расчеты системы с минимальным числом участвующих реакций, например всего двух реакций, а затем, если экспериментальные и теоретические кривые не совпадают ни при каких значениях констант скоростей, вводится третье уравнение в вновь начинается подбор констант [23]. Процедура повторяется до удовлетворительного совпадения экспериментальных и расчетных кинетических кривых при всех вариантах эксперимента, например, при различных начальных концентрациях реагентов. Этот метод дает однозначные результаты, но весьма трудоемок. В последнее время нами совместно с дипломником Л.П. Батовым была разработана программа, позволяющая автоматически подбирать константы путем сопоставления расчетных данных с экспериментальными методом наименьших квадратов.

Пример экспериментальных и расчетных кривых, полученных описанным выше способом, приведен на рис. 5 [23].

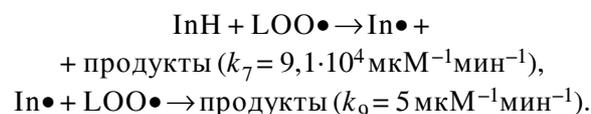
### ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТОВ

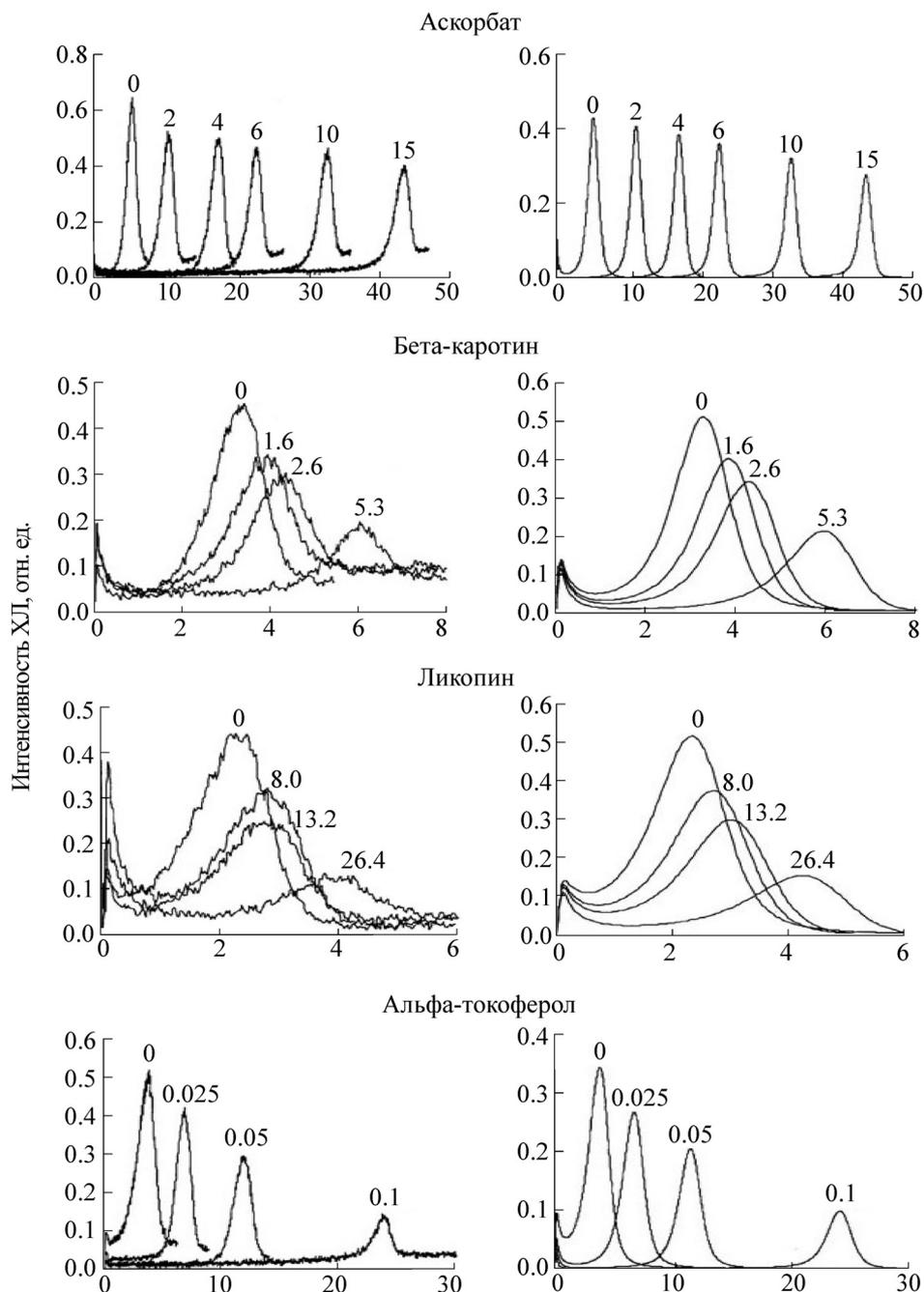
Первые исследования активности антиоксидантов методами кинетической хемилюминесценции были проведены с альфа-токоферолом [24], стероидными гормонами [25–28] и тироксином [29]. Во всех этих случаях антиоксидант добавляли к суспензии митохондрий и изучали изменение кинетики хемилюминесценции, возникающей при введении в систему солей двухвалентного железа. Математическое моделирование полученных при этом кинетических кривых показало соответствие расчетных и экспериментальных кривых, хотя и не достаточно полное в деталях [30]. Впрочем, относительные активности антиоксидантов были при этом оценены.



**Рис. 5.** Кривые хемилюминесценции, сопровождающей цепное окисление липидов в суспензии липосом после добавления ионов  $Fe^{2+}$ . (а) – Экспериментальные кривые, (б) – рассчитанные кривые. Цифры у кривых – концентрация добавленного  $Fe^{2+}$ , мкМ. Реакционная смесь содержала 0,4 мг липидов на 1 мл, 0,1 мкМ С-525 и 20 мМ трис-НСl, pH 7,4. Реакции в модели:  $Fe^{2+} + LH \rightarrow LOO\bullet + Fe^{3+}$  ( $k_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ ),  $LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + LOO\bullet$  ( $k_3 = 7,3 \cdot 10^{-3}$ ),  $LOOH + Fe^{2+} \rightarrow LOO\bullet + Fe^{3+}$  ( $k_p = 2,6$ ),  $LOO\bullet + LOO\bullet \rightarrow P^1 + \text{фотон}$  ( $k_6 = 7$ ),  $LOO\bullet + Fe^{2+} \rightarrow P^3 + Fe^{3+}$  ( $k_9 = 1,5$ ) [23].

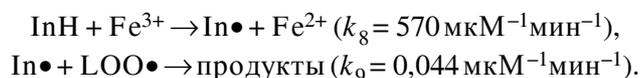
Разработка более качественной аппаратуры, использование активатора свечения, кумарина С-525, и применение специализированной программы «Кинетика» позволило добиться существенно лучших результатов в отношении совпадения теоретических и экспериментальных кривых (рис. 6) [31]. При этом было обнаружено, что не только константы реакций взаимодействия молекулы антиоксиданта и радикала были разными у разных веществ, но и сам механизм действия разных антиоксидантов мог различаться. Так, в случае альфа-токоферола одна молекула антиоксиданта вступала в реакцию с двумя пероксильными радикалами:



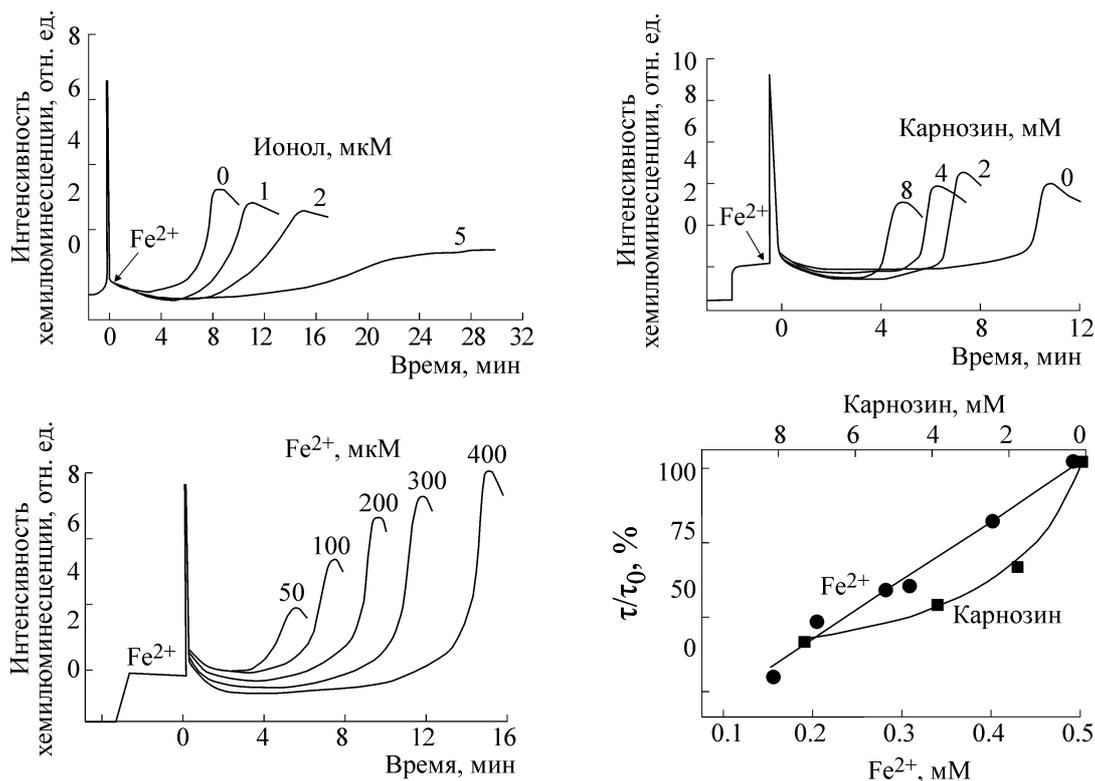


**Рис. 6.** Сравнение экспериментальных (левые кривые в каждой паре) и рассчитанных (правые кривые) кривых хемилюминесценции в суспензии липосом, к которым добавляли одно и то же количество  $\text{Fe}^{2+}$  и разные концентрации антиоксидантов. Состав среды и схема основных реакций, как на рис. 5. Реакции антиоксидантов с радикалами и константы скоростей этих реакций приводятся в тексте. По данным работы [31].

По сходному механизму (но с другими константами реакций) работали ликопин, бета-каротин и ионол, тогда как аскорбиновая кислота в данном случае работала как восстановитель ионов железа:



Своеобразным механизмом действия в железосодержащей системе обладает еще один известный антиоксидант, карнозин [32–36]. Его действие на кинетику перекисного окисления липидов в присутствии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  оказалось необычным для антиоксиданта-перехватчика радикалов (рис. 7). Все антиоксиданты-перехватчики, например ионол (см. также рис. 6),



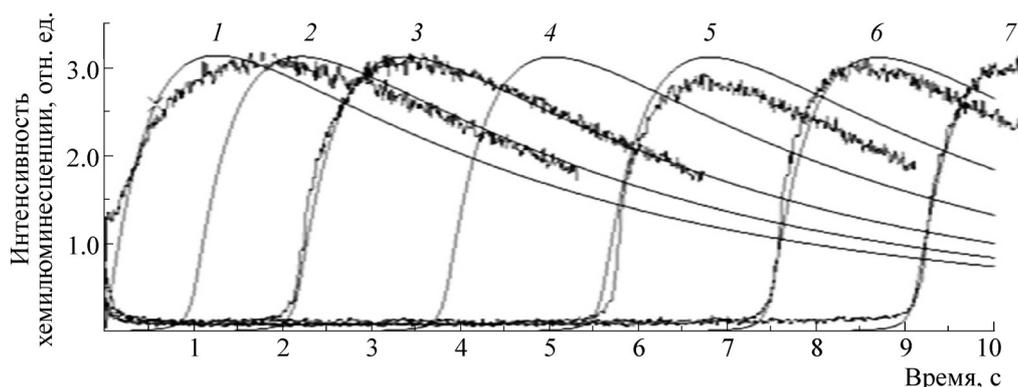
**Рис. 7.** Сравнение действия перехватчика радикалов ионола и дипептида карнозина на кинетику хемилюминесценции в суспензии липосом, к которым добавили ионы  $Fe^{2+}$ . Объяснения даны в тексте. Условия инкубации суспензии и регистрации свечения описаны в оригинальной работе [37].

увеличивают латентный период хемилюминесценции, а карнозин его сокращает. В этом отношении он оказывает такое же действие, как снижение концентрации ионов  $Fe^{2+}$ . Было высказано предположение, что причина заключается в том, что карнозин связывает ионы  $Fe^{2+}$ , не давая им тем самым возможности участвовать в разветвлении цепей в реакции липопероксидации [37]. На основании обработки полученных данных была найдена константа связывания  $Fe^{2+}$  карнозином, которая оказалась достаточно большой (половинное связывание при 2,4 мМ), чтобы обеспечить практически полное связывание ионов железа в мышечных клетках, где концентрация карнозина достигает 20 мМ.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ В СИСТЕМЕ 2,2'-АЗО-БИС(2-АМИДИНОПРОПАН) + ЛЮМИНОЛ

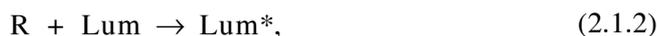
Для практических целей, например для определения общего содержания антиоксидантов в крови, других биологических жидкостях, в тканях животных и растений, пищевых продуктах и напитках, – сложные системы, наподобие раз-

ветвленных реакций цепного окисления липидов в биологических мембранах, малоприспособлены. Поэтому получили большое распространение методы, основанные на определении одного–двух параметров, а не на анализе кинетики в целом. Классический пример – метод, предложенный Лисси, который основан на оценке латентного периода в развитии хемилюминесценции, возникающей в системе АБАП + люминол [38]. 2,2'-Азо-бис(2-амидинопропан) (АБАП) при термическом распаде дает два радикала, реакции которых с люминолом сопровождаются хемилюминесценцией. Антиоксиданты перехватывают эти радикалы, и пока антиоксидант не окислился, хемилюминесценция не развивается. Этот метод, получивший название TRAP (total radical-trapping potential) [39,40], вполне пригоден для определения общего содержания антиоксидантов, но не дает возможности определить одновременно концентрацию и активность антиоксиданта, даже если он один. В последнее время в нашей лаборатории были проведены исследования антиоксидантной активности различных соединений путем анализа кинетики хемилюминесценции в данной системе. В качестве примера на рис. 8 показаны типичные кривые хемилюминесценции при воз-

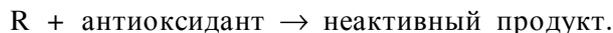


**Рис. 8.** Кинетические кривые хемилюминесценции (кривые с шумами) и рассчитанные при помощи программы Kinetic Analyser. Экспериментальные данные были получены с антиоксидантом – тролоксом. Концентрации реагентов: АБАП – 3 мМ, люминол – 10 мкМ, тролокса: 1 – 0 мкМ; 2 – 0,1 мкМ; 3 – 0,2 мкМ; 4 – 0,4 мкМ; 5 – 0,6 мкМ; 6 – 0,8 мкМ; 7 – 1,0 мкМ. Данные получены аспирантом А.В. Алексеевым.

растающих концентрациях дигидрокверцетина. Математическое моделирование кинетики показало, что кривые неплохо описываются уравнениями для следующей системы реакций:



(Аналитическая реакция)



Константы скоростей первых трех реакций были соответственно равны  $1,7 \cdot 10^{-5}$ ,  $9 \cdot 10^4$  и  $2,1 \cdot 10^{10}$ , константы скорости реакции антиоксиданта с радикалами были, естественно, разными для разных соединений. Таким образом, этот метод позволяет не только определять общее содержание антиоксиданта в системе, но и оценивать его активность как константу скорости его реакции с радикалами. Кроме того, с его использованием нам удалось определить константы скоростей двух реакций антиоксиданта с радикалами, что характерно для фенольных производных.

#### ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЕ ПЕРОКСИДАЗАМИ

В присутствии пероксидаз люминол окисляется пероксидом водорода с образованием радикалов, что сопровождается яркой хемилюминесценцией. В частности, с использованием измерения хемилюминесценции было показано, что цитохром *c*, образуя комплекс с кардиолипином [41], становится пероксидазой [42]. Пероксидазная реакция подавлялась антиоксидантами в микромолярных концентрациях [43]. Ес-

ли субстратом окисления были полиненасыщенные жирные кислоты, то комплекс цитохрома *c* с кардиолипином образовывал липопероксильные радикалы, которые запускали реакцию цепного окисления липидов. При этом в присутствии кумарина С-525 наблюдалась хемилюминесценция, анализ кинетики которой позволил предложить схему реакций [44]. В последнее время в нашей лаборатории было показано методом кинетической хемилюминесценции, что основные реакции пероксидазного цикла комплекса цитохрома *c* с кардиолипином соответствуют реакциям других пероксидаз млекопитающих (см. обзор [45]), и были определены константы скоростей основных реакций. Эта работа в настоящее время готовится к печати.

Методом активированной С-525 хемилюминесценции было также исследовано действие антиоксидантов на образование липидных пероксил-радикалов при окислении липидов в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Были оценены активности ряда флавоноидов и других антиоксидантов. Все они оказывали действие в весьма низких концентрациях. Было сделано предположение, что биологическое действие антиоксидантов основано не только на том, что они обрывают цепи окисления липидов, но и на торможении реакций, катализируемых пероксидазами [43].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
2. Ю. А. Владимиров и Ф. Ф. Литвин, Биофизика **4** (5), 601 (1959).
3. Б. Н. Тарусов, А. И. Поливуда и А. И. Журавлев, Биофизика **6** (4), 490 (1961).

4. Б. Н. Тарусов, А. Н. Поливода и А. И. Журавлев, *Радиобиология* **1** (1), 150 (1961).
5. Б. Н. Тарусов, А. Н. Поливода, А. И. Журавлев и Е. Н. Секамова, *Цитология* **4** (6), 696 (1962).
6. О. Ф. Львова и Ю. А. Владимиров, в *Тезисах докл. симпозиума «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»* (1964), с. 34.
7. О. Ф. Львова и Ю. А. Владимиров, в *Тез. докл. XIII Совецания по люминесценции. Харьков 25 июня–1 июля 1964* (1964), с. 75–76.
8. О. Ф. Львова, Автореферат дис. ... канд. мед. наук (1966).
9. О. Ф. Львова и Ю. А. Владимиров, *Труды Московского общества испытателей природы* **16**, 214 (1966).
10. Т. Б. Суслова, В. И. Оленев и Ю. А. Владимиров, *Биофизика* **13**, 723 (1968).
11. Т. Б. Суслова, В. И. Оленев и Ю. А. Владимиров, *Биофизика* **14**, 510 (1969).
12. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*, ред. Г. М. Франк (Наука, М., 1972).
13. Ю. А. Владимиров, П. И. Гутенев и П. И. Кузнецов, *Биофизика* **18**, 1024 (1973).
14. Ю. А. Владимиров и М. П. Шерстнев, *Хемилюминесценция клеток животных. Итоги науки и техники, сер. Биофизика*, ред. П. В. Нестеров (ВИНИТИ, М., 1989).
15. Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин и Тань-Мань-ци, *Тезисы докл. XI Совецания по люминесценции «Молекулярная люминесценция и люминесцентный анализ»* (1962).
16. Ю. А. Владимиров, *Сверхслабые свечения при биохимических реакциях*, ред. Г. М. Франк (Наука, М., 1966).
17. Y. A. Vladimirov, in *Free radicals in the environment, medicine and toxicology*, by eds. H. Nohl, H. Esterbauer, and C. Rice-Evans (Richelieu Press: London, 1994), pp. 345–373.
18. Y. A. Vladimirov, in *Free radicals. A practical approach*, by eds. N. A. Punchard and F. J. Kelly (Oxford University Press: Oxford, New York, Tokyo, 1996), pp. 65–82.
19. Ю. А. Владимиров, Т. Б. Суслова и В. И. Оленев, *Биофизика* **14**, 836 (1969).
20. Y. A. Vladimirov, V. I. Olenev, T. B. Suslova, and Z. P. Cheremisina, *Advances in Lipid Research* **17**, 173 (1980).
21. Y. A. Vladimirov, in *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases*, by eds. J. E. Johnson, Jr., et al., (Allan R. Liss, Inc.: New York, 1986), pp. 141–195.
22. Y. A. Vladimirov, in *Physicochemical aspects of medicine. Reviews. Soviet Medical Reviews, Section B*, by ed. Y. M. Lopukhin (Harwood Academic Publishers GmbH: London, 1987), pp. 51–127.
23. Д. Ю. Измайлов и Ю. А. Владимиров, *Биол. мембраны* **19** (6), 507 (2002).
24. Ю. А. Владимиров, Э. Е. Тафельштейн и Ю. П. Козлов, *Докл. АН СССР* **188**, 1163 (1969).
25. Ю. А. Владимиров, П. В. Сергеев, Р. Д. Сейфулло и Ю. Н. Руднев, *Молекуляр. биология* **7**, 247 (1973).
26. В. М. Гукасов, Ю. А. Владимиров, Р. Д. Сейфулло и П. В. Сергеев, *Биофизика* **19**, 763 (1974).
27. В. М. Гукасов, П. В. Сергеев, Р. Д. Сейфулло и Ю. А. Владимиров, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **78** (11), 54 (1974).
28. П. В. Сергеев, Ю. А. Владимиров, Р. Д. Сейфулло и др., *Вопр. мед. химии* **20**, 359 (1974).
29. Ю. А. Владимиров, В. М. Гукасов, В. К. Федоров и П. В. Сергеев, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **5**, 558 (1977).
30. Y. A. Vladimirov, *Studies of antioxidant activity by measuring chemiluminescence kinetics*, in ISNA, L. Paker, Editor. 1996, ISNA: NY. p. 125–241.
31. Д. Ю. Измайлов и Ю. А. Владимиров, *Биол. мембраны* **20** (4), 349 (2003).
32. A. A. Boldyrev, S. L. Stvolinsky, T. N. Fedorova, and Z. A. Suslina, *Rejuvenation Res.* **13** (2–3), 156 (2010).
33. L. A. Bokeriya, A. A. Boldyrev, R. R. Movsesyan, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **145** (3), 323 (2008).
34. E. S. Arzumanyan, A. V. Makhro, O. V. Tyulina, and A. A. Boldyrev, *Dokl. Biochem. Biophys.* **418**, 44 (2008).
35. T. N. Fedorova, M. G. Macletsova, A. V. Kulikov, et al., *Dokl. Biol. Sci.* **408**, 207 (2006).
36. D. Dobrota, T. Fedorova, S. Stvolinsky, et al., *Neurochem Res.* **30** (10), 1283 (2005).
37. Ю. А. Владимиров, А. А. Болдырев, А. И. Деев и др., *Биофизика* **33** (1), 140 (1988).
38. E. Lissi, C. Pascual, and M. D. Del Castillo, *Free Radic. Res. Commun.* **17** (5), 299 (1992).
39. E. Lissi, C. Pascual, and M. D. del Castillo, *Free Radic. Biol. Med.* **16** (6), 833 (1994).
40. E. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, and M. D. del Castillo, *Free Radic. Biol. Med.* **18** (2), 153 (1995).
41. Ю. А. Владимиров, Ю. Ц. Ноль и В. В. Волков, *Кристаллография* **56** (4), 712 (2011).
42. N. A. Belikova, Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, et al., *Biochemistry* **45** (15), 4998 (2006).
43. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Е. М. Демин и др., *Биохимия* **74** (3), 372 (2009).
44. Ю. А. Владимиров, Е. М. Демин, Е. В. Проскурнина и А. Н. Осипов, *Биол. мембраны* **26** (6), 493 (2009).
45. P. G. Furtmuller, W. Jantschko, M. Zederbauer, et al., *Jpn. J. Infect. Dis.* **57** (5), S30 (2004).
46. Y. A. Vladimirov, A. Arroyo, J. M. Taylor, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **384** (1), 154 (2000).
47. V. S. Sharov, V. A. Kazamanov, and Y. A. Vladimirov, *Free Radical. Biol. Med.* **7**, 237 (1989).

## **Kinetic Chemiluminescence as a Method for the Study of Free Radical Reactions**

**Yu.A. Vladimirov, E.V. Proskurnina, and D.Yu. Izmajlov**

*Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119991 Russia*

The review gives concepts of analysis of kinetics of complex reactions with the participation of free-radicals. The concepts are based on the comparison of the kinetic curves of the chemiluminescent reactions in the presence of a physical enhancer coumarin C-525 with the simulated kinetic functions. This method was applied to the investigation of the mechanism of a branched-chain reaction of lipid peroxidation in biological and phospholipid membranes as well as to the effect of antioxidants and determination of their activities. It was also used for studying the reaction of the formation of free radicals in the complex of cytochrome *c* with cardiolipin. This reaction plays a key role in the initiation of apoptosis.

*Key words: free radicals, chemiluminescence, activators of chemiluminescence, lipid peroxidation*