

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова
Российской академии наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

На правах рукописи

Зинатуллина Карина Марсовна

**КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ
ГИДРОФИЛЬНЫХ ТИОЛОВ**

1.4.4. Физическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Касаикина Ольга Тарасовна

Москва – 2021

Оглавление

| | |
|--|-----------|
| Введение | 4 |
| Глава 1. Обзор литературы | 14 |
| 1.1. Феноменология действия антиоксидантов в процессах окисления..... | 14 |
| 1.2. Серосодержащие соединения. Природные тиолы | 19 |
| Глава 2. Экспериментальная часть..... | 41 |
| 2.1. Реактивы..... | 41 |
| 2.2. Методика проведения эксперимента и методы анализа | 47 |
| Глава 3. Кинетические характеристики взаимодействия природных тиолов и фенолов с пероксильными радикалами | 52 |
| 3.1. Кинетические характеристики взаимодействия тиолов с пероксильными радикалами..... | 52 |
| 3.2. Кинетические характеристики взаимодействия ресвератрола с пероксильными радикалами..... | 56 |
| Глава 4. Кинетика и механизм взаимодействия глутатиона и других природных тиолов с пероксидом водорода..... | 63 |
| 4.1. Кинетические закономерности реакции глутатиона с пероксидом водорода . | 64 |
| 4.2. Определение природы радикалов, образующихся в реакции глутатиона с пероксидом водорода..... | 69 |
| 4.3. Тиол-ен реакция глутатиона с ресвератролом в присутствии пероксида водорода. Кинетическая модель | 72 |
| 4.4. Ацетилцистеин – кинетический аналог глутатиона в реакциях с активными формами кислорода..... | 81 |
| Глава 5. Влияние рН среды и биологически значимых катионов на взаимодействие глутатиона с активными формами кислорода | 85 |
| 5.1. Влияние среды на взаимодействие тиолов с пероксильными радикалами..... | 85 |
| 5.2. Влияние рН среды на взаимодействие глутатиона с пероксидом водорода.... | 87 |
| 5.3. Влияние рН среды и биологически значимых катионов на тиол-ен реакцию глутатиона с ресвератролом в присутствии пероксида водорода..... | 89 |

| | |
|--|------------|
| 5.4. Влияние среды на антиокислительные эффекты глутатиона при окислении липидов..... | 96 |
| Заключение..... | 101 |
| Основные результаты и выводы | 103 |
| Список сокращений и условных обозначений | 104 |
| Список литературы..... | 107 |

Введение

Актуальность работы. Пионерские работы под руководством академика Н. М. Эмануэля [1–6] положили начало исследований свободно-радикальных окислительных процессов (окислительный стресс), которые имеют место и играют существенную роль в живых организмах. В настоящее время интенсивные медико-биологические исследования окислительного стресса в многочисленных отечественных и зарубежных научных центрах показывают, что окислительный стресс сопровождает, а в ряде случаев провоцирует развитие многих заболеваний, включая рак, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные болезни, синдром приобретенного иммунодефицита, старение. Окислительный стресс характеризуется повышенным содержанием активных форм кислорода (АФК) и отражает дисбаланс между скоростями образования АФК и их утилизации. Образование АФК в процессе аэробного метаболизма клеток всех типов и широкий спектр физиологических эффектов АФК объясняют неослабевающий интерес и актуальность всестороннего изучения их генерирования и детоксикации, выявления роли АФК в формировании иммунного ответа живых организмов на внешние воздействия, химических механизмов саморегуляции открытой системы, сохраняющей относительное постоянство внутреннего динамического равновесия.

Серосодержащие соединения давно известны как восстановители пероксидов и применяются на практике в антиокислительных композициях. Реакции с АФК и тиол-дисульфидного обмена с участием тиольных SH-групп, остатков аминокислоты цистеина в белках и низкомолекулярных пептидах играют важную роль в функционировании живых организмов и формировании иммунной системы. Пандемия 2020–2021 гг. в определенной степени подняла уровень актуальности исследований биохимических реакций тиолов глутатиона (GSH) и, в особенности, *N*-ацетилцистеина (ASH), который применяют как муколитический препарат в лечении начальных стадий COVID-19. Глутатион (GSH) – трипептид γ -глутамил-цистеинил-глицин, главный эндогенный низкомолекулярный биоантиоксидант, синтезируется непосредственно в живых организмах, присутствует во всех клетках

и тканях в миллимольной концентрации, что значительно выше концентраций других потенциальных биоантиоксидантов, например, витаминов E, A, C, катехоламинов. Для тиолов и многих серосодержащих соединений характерны гетеролитические окислительно-восстановительные реакции с переносом электрона и нуклеофильного замещения. В последние годы активно изучаются «Тиол-ен реакции» – реакции взаимодействия тиолов с ненасыщенными соединениями, в связи с так называемыми клик-реакциями («Thiol–Ene Click Chemistry»), которые применяют для синтеза линейных и разветвленных гетероцепных соединений, в том числе в медицинской химии для синтеза новых препаратов. Недавно было обнаружено, что при взаимодействии тиолов с хиноидными соединениями наряду с известным нуклеофильным замещением в ароматическом кольце имеет место радикально-цепная тиол-ен реакция, в которой расходуются оба компонента [7]. Образование радикалов в реакции тиола с гидропероксидами, приводящее к ускорению процесса было установлено при окислении ряда углеводов и липидов с добавками меркаптоэтанола.

Природные тиолы являются сугубо гидрофильными соединениями и функционируют в полярной водной среде. Тиолы, особенно GSH, известны как полифункциональные биоантиоксиданты, которые взаимодействуют с гидроксильными и пероксильными радикалами, восстанавливают гидропероксиды, дисульфидные связи в белках. В живых организмах восстановление гидропероксидов и регенерация GSH из дисульфида происходят ферментативным путем с участием, соответственно, глутатионпероксидаз и глутатионредуктаз. С H_2O_2 тиолы взаимодействуют напрямую, и эту реакцию активно изучают, поскольку редокс пара GSH / GSSG и H_2O_2 занимает центральное место в определении окислительно-восстановительного гомеостаза и внутриклеточной передачи информации – клеточного сигналинга. Однако в настоящее время в литературе не представлены систематические исследования кинетических закономерностей и обоснованного механизма реакций тиолов с активными формами кислорода, влияния среды на эти реакции, а также взаимодействия тиолов, главным образом, глутатиона, с другими эндогенными и экзогенными

антиоксидантами. Большинство исследований в этой области проводится в органических и различных водных буферных средах при физиологических рН 7,2–7,4, в гомогенатах биологических тканей и модельных средах. В результате имеет место большой разброс в значениях количественных кинетических характеристик реакций тиолов с АФК и предлагаемых механизмах.

Степень разработанности темы исследования. Со времени открытия цистеина и глутатиона [8] опубликованы миллионы исследований посвященных эндогенным тиолам, их метаболизму, роли в развитии многих заболеваний, эффективности и механизму антиокислительного действия. Поскольку тиоловые редокс системы функционируют в буферной среде при рН 7,2–7,4, долгое время предполагалось, что реакции тиолов с АФК протекают гетеролитически или по механизму нуклеофильного замещения [9–19]. С другой стороны, многие авторы утверждают, что тиолы активно реагируют с радикалами с образованием в обменных реакциях тиольных радикалов [20], которые исследовали методом спиновых ловушек, например, [21]. В работах разных авторов отмечается, что значения константы скорости реакции тиолов с супероксид анионом $O_2^{\cdot-}$ варьируются на четыре порядка величины $\sim 10\text{--}10^5 (M \times c)^{-1}$.

В живых организмах восстановление гидропероксидов осуществляется глутатионпероксидазами, ферментами, специфичными для органов и тканей, которые, используют GSH в качестве субстрата и эффективно восстанавливают не только H_2O_2 , но и органические гидропероксиды, включая гидропероксиды мембранных полиненасыщенных жирных кислот. Серия фундаментальных работ по механизму реакций природных тиолов с пероксидом водорода в водной среде была начата более 30 лет назад коллективом авторов [22–25]. Авторы представили достаточно убедительные результаты спектроскопических (УФ и ИК) исследований и теоретического анализа образования промежуточных комплексов $[GSH - H_2O_2]$ не только в буферных растворах с нейтральным и физиологическим рН, но и в чистой воде, когда образуется кислая реакционная смесь с рН 2. Так же, как в работах [9–20], они установили, что в целом реакция тиолов (глутатиона, цистеина, ацетилцистеина) с H_2O_2 следует стехиометрическому уравнению:

$2TSH + H_2O_2 \rightarrow TSST + 2H_2O$, однако кинетика и механизм взаимодействия тиолов с H_2O_2 и вопрос об основных факторах, влияющих на биологически значимую редокс сигнальную систему $GSH / GSSG - H_2O_2$, остается открытым.

Реакции тиолов с олефинами (тиол-ен реакции, гидротиолирование алкенов) с образованием тиоэфиров известны давно с 1905 г. В последние десятилетия им уделяется большое внимание в связи с возможностью селективного и стереоселективного синтеза разнообразных соединений в полимерной и медицинской химии. Эти реакции могут протекать по радикальному механизму при окислении липидов, когда в обменных реакциях образуются тиольные радикалы и присоединяются по двойной связи олефинов [26]. Но эти реакции изучены в органической среде, в которой гидрофильные тиолы практически не растворяются, и данных о тиол-ен реакциях с участием GSH и других эндогенных тиолов с ненасыщенными соединениями практически нет. В целом, до начала наших работ механизм реакций водорастворимых тиолов с пероксильными радикалами и H_2O_2 в водных растворах был изучен поверхностно и слабо подкреплялся кинетическими данными, а образование радикалов в реакции тиолов с H_2O_2 и инициирование образовавшимися тиольными радикалами тиол-ен реакций с фенолами, содержащими ненасыщенную связь в боковой цепи, и влияние pH среды на кинетику и механизм этих реакций исследовано впервые.

Цель работы: выявить кинетические закономерности и механизм радикальных реакций гидрофильных тиолов с активными формами кислорода в водных растворах, выяснить роль среды.

Основные задачи:

1. Найти оптимальный водорастворимый акцептор пероксильных и тиольных радикалов, инертный по отношению к тиолам и пероксидам.
2. Определить кинетические характеристики реакций тиолов с пероксильными радикалами, образующимися при распаде водорастворимого инициатора ААРН.

3. Выявить кинетические закономерности взаимодействия тиолов с H_2O_2 в деионизированной воде. Определить скорости образования радикалов в реакциях тиолов с H_2O_2 методом ингибиторов.

4. Определить природу радикалов, образующихся при взаимодействии тиолов с H_2O_2 в воде методом ЭПР с использованием спиновой ловушки.

5. Изучить кинетические закономерности и механизм тиол-ен реакции тиолов с фенолом, содержащим ненасыщенную связь в боковой цепи, ресвератролом, провести анализ образующихся продуктов.

6. Выяснить влияние pH и биологически значимых катионов ацетилхолина (ACh^+), Na^+ и K^+ на скорости расщепления глутатиона и инициирование радикалов при взаимодействии глутатиона с H_2O_2 .

7. Предложить кинетически обоснованный механизм реакций глутатиона с H_2O_2 и инициированной тиольными радикалами тиол-ен реакции глутатиона с ресвератролом; разработать кинетическую модель для компьютерного моделирования.

Научная новизна:

1. Детально изучена кинетика и механизм радикальных реакций природных тиолов с пероксильными радикалами и H_2O_2 в деионизированной воде, определены константы скорости реакций с радикалами и предложена кинетическая модель сложного механизма взаимодействия глутатиона с H_2O_2 .

2. Обнаружено, что в деионизированной воде взаимодействие тиолов (глутатиона, цистеина, гомоцистеина, ацетилцистеина) с H_2O_2 сопровождается образованием тиольных радикалов, природа которых установлена методом ЭПР с использованием спиновой ловушки. Показано, что при $\text{pH} > 7$ радикалы не образуются.

3. Выявлены кинетические закономерности и установлен механизм тиол-ен реакции глутатиона с ресвератролом – фенолом, содержащим ненасыщенную связь в боковой цепи, в деионизированной воде в присутствии H_2O_2 ; предложена кинетическая модель радикально-цепной тиол-ен реакции.

4. Установлено существенное влияние pH на скорости реакций глутатиона при взаимодействии с пероксильными радикалами и H_2O_2 : в фосфатных буферных растворах при $\text{pH} \geq 7$ увеличивается активность GSH в реакциях с пероксильными радикалами и H_2O_2 , изменяется механизм взаимодействия глутатиона с H_2O_2 , а в диапазоне физиологических pH 6,8–7,4 скорость реакции GSH с H_2O_2 описывается экспоненциальной зависимостью $\lg W_{\text{TSH}} = \text{const} + \text{pH}$.

5. Обнаружено влияние катионов ацетилхолина (ACh^+) и K^+ на взаимодействие GSH и H_2O_2 . Нейромедиатор ацетилхолин более чем в два раза увеличивает, а катионы K^+ , напротив, почти в полтора раза уменьшают скорость образования радикалов при взаимодействии GSH и H_2O_2 .

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе результаты по кинетике и механизму радикальных реакций глутатиона и других тиолов в деионизированной воде расширяют и значительно дополняют фундаментальные знания о механизме реакций природных тиолов с АФК и другими биоантиоксидантами. Совокупность полученной кинетической информации (константы скорости реакций с радикалами и кинетические модели взаимодействия GSH и H_2O_2) могут служить реперным кинетическим пакетом при изучении влияния компонентов водной среды на поведение тиолов в реакциях с активными формами кислорода.

Предложенные в данной работе экспериментально обоснованные кинетические модели реакции глутатиона с пероксидом водорода и тиол-ен реакции глутатиона с ресвератролом могут быть использованы для прогнозирования и оценки воздействия на живые организмы совместного действия тиолов с биоантиоксидантами в условиях окислительного стресса.

Системы на основе тиолов оказывают многофакторное влияние на клеточный окислительно-восстановительный метаболизм, антиоксидантную защиту и передачу сигналов. Поэтому полученные количественные данные могут быть использованы при конструировании биоподобных объектов в синтетической биологии.

Использованный в работе водорастворимый анионный полиметиновый краситель А, акцептор пероксильных и тиольных радикалов, инертный по отношению к тиолам и пероксидам, можно рекомендовать для оценки антирадикальной активности методом конкурирующих реакций и определения скоростей инициирования радикалов методом ингибиторов в водных средах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выявление природы радикалов и условий их образования в реакции тиолов с H_2O_2 .
2. Кинетика и механизм тиол-ен реакции GSH с фенолами, содержащими двойную связь в боковой цепи, на примере ресвератрола в присутствии H_2O_2 .
3. Влияние pH и ионного состава среды на реакцию глутатиона с H_2O_2 .
4. Оценка активности природных тиолов в реакциях с пероксильными радикалами в водных растворах с различными pH.

Методология и методы исследования. В работе использованы апробированные экспериментальные методы, обеспечивающие достоверность экспериментальных данных: метод кинетической УФ-спектрофотометрии, методы ЭПР и масс-спектропии, метод изотермической калориметрии. Основная часть работы посвящена изучению кинетики расходования глутатиона и акцепторов радикалов при взаимодействии тиола с пероксидом водорода при разных концентрациях реагентов в воде и буферных средах для чего использовался метод кинетической УФ-спектрофотометрии. Скорости образования радикалов в реакции тиолов с пероксидом водорода регистрировали методом ингибиторов с применением оригинального акцептора радикалов – полиметинового красителя с уточненными спектрально-кинетическими характеристиками. Природу радикалов подтвердили методом ЭПР с использованием известной спиновой ловушки. Продукты, образующиеся в реакции глутатиона с H_2O_2 и в тиол-ен реакции глутатиона с ресвератролом в присутствии H_2O_2 , исследовали методом масс-спектрометрии.

Объекты исследования: водорастворимые тиолы глутатион, гомоцистеин фирмы «Sigma-Aldrich», а также цистеин и синтетический тиол *N*-ацетилцистеин

фирмы «AcrosOrganics»; фенол, с ненасыщенной связью в боковом заместителе ароматического кольца, транс-ресвератрол фирмы «abcгGmbH», водорастворимый азоинициатор (AAPH) – фирмы «Fluka»; пероксид водорода фирмы «PanReasAppliChem» – все реактивы марки ОЧ. В качестве растворителя использовали деионизированную воду.

Экспериментальная работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук.

Личный вклад соискателя. Представленные в работе результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. Вклад автора диссертационной работы во все публикации является основным и состоит в подготовке и проведении спектроскопических исследований, компьютерного моделирования, обработке полученных экспериментальных данных и их интерпретации, формулировании выводов, участии в обсуждении результатов и подготовке их к публикации. Материалы диссертации доложены автором в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях.

Природу радикалов, образующихся при взаимодействии тиолов с H_2O_2 , определяли методом ЭПР совместно с д.ф.-м.н. М. В. Мотякиным, константу скорости рекомбинации фенилтиильных радикалов определяли методом флеш-фотолиза совместно с д.х.н. В. А. Кузьминым и к.х.н. А. А. Костюковым, масс-спектры тиолов и продуктов окисления регистрировала М. И. Индейкина, кинетику тепловыделения методом изотермической калориметрии измерил к.х.н. М. П. Березин, поглощение O_2 при окислении тиолов измерил к.х.н. Д. В. Лошадкин, константы скорости реакции методом хемилюминисценции измерила к.х.н. И.Ф. Русина.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность результатов научных исследований, полученных в работе, подтверждается

корректным использованием современных методов исследования, применяемых в физической химии, планированием проведения экспериментальных исследований и привлечением профессионалов к обсуждению полученных результатов, тщательностью и повторностью проведения экспериментов, а также не превышением погрешности определения более чем на 10% при определении кинетических характеристик исследуемых реакций.

Апробация работы. Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях: 1st International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants, Porto, Portugal, 2016; I and II International Conferences on Bioantioxidants, 2017, Sofia, and 2018 Varna, Bulgaria; МОБИ-ХимФарма 2017, Крым, Севастополь; 15th Euro Fed Lipid Congress, 2017, Uppsala, Sweden; XXXV Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике, Пансионат "Берёзки" (Московская область), 2018 г.; 2nd International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants 2018, Graz, Austria; 1st International Conference on Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis (RKMC 2018) 2018, Budapest, Hungary; XVI International Conference on Surface Forces, 2018, Kazan, Russia; IV Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике МОБИ-ХимФарма 2018, Новый Свет, Крым; "World Summit on Catalysis Engineering and Technology", 2019, Valencia, Spain; X Международная конференция «БИОАНТИОКСИДАНТ», Москва, 2020 г.; Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты: международная конференция молодых ученых и школа им. Академика Н. М. Эмануэля 2015 и 2019 гг.; Ежегодная международная молодежная конференция ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» 2015–2017 и 2019 гг.; ежегодная научная конференция ФИЦ ХФ РАН, секция «Динамика химических и биологических процессов» 2016–2021 гг.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 статей в рецензируемых журналах, 12 статей в сборниках научных статей и 14 тезисов в сборниках конференций.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 17–03–00364, № 18–33–00742, № 20–03–00753, РНФ № 14–23–0018 государственного задания РФ (проект № 0082–2018–0006).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, основных результатов и выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, включая 45 рисунков, 19 таблиц и 3 схемы. Список цитируемой литературы содержит 309 ссылок.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Феноменология действия антиоксидантов в процессах окисления

Парадокс аэробной жизни заключается в том, что живые организмы не могут существовать без кислорода, однако кислород, по своей сути, опасен для их существования. Окисление органических веществ кислородом – это источник энергии. Но атмосферный кислород в основном состоянии является бирадикалом, и окисление органических субстратов (LH) часто происходит по свободно-радикальному механизму [27] с образованием активных форм кислорода (АФК) таких как $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, LO_2^{\cdot} , HOON , LOON , которые ответственны за токсичность кислорода. Фундаментальный вклад в изучение механизмов свободно-радикального окисления, разработку теории жидкофазного окисления углеводов и липидов, выяснение возможностей применения и путей регулирования окислительных процессов внесли российские ученые под руководством акад. Н. М. Эмануэля [28–30]. Новые результаты исследований в области окисления и механизмов действия антиоксидантов обобщены в монографиях проф. Е. Т. Денисова [31–33] и других российских [34; 35] и в большом количестве во многом повторяющихся монографий и обзоров зарубежных ученых [36–41].

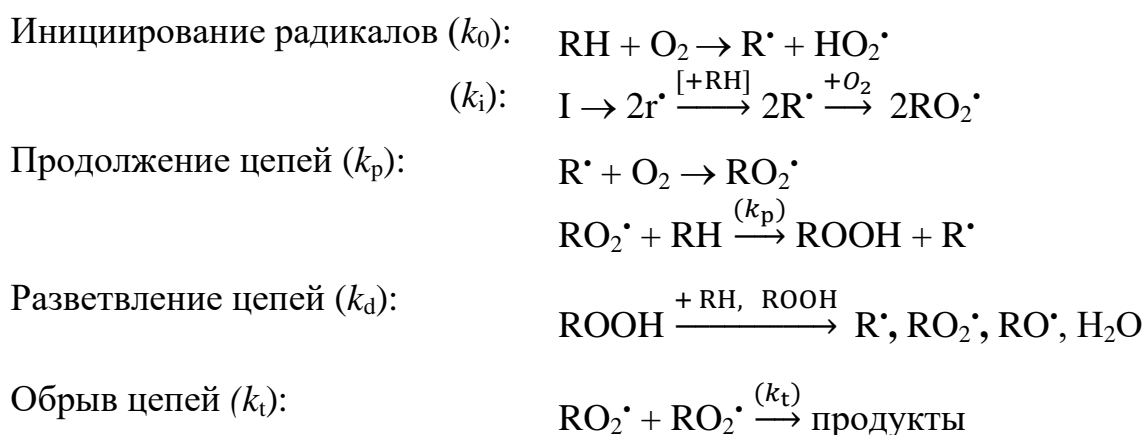
Пионерские работы под руководством академика Н. М. Эмануэля положили начало исследований свободно-радикальных окислительных процессов (окислительный стресс), которые имеют место и играют существенную роль в живых организмах [1–6]. В настоящее время интенсивные медико-биологические исследования окислительного стресса в многочисленных отечественных и зарубежных научных центрах показывают, что окислительный стресс сопровождает, а в ряде случаев провоцирует развитие многих заболеваний, включая рак, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные болезни, синдром приобретенного иммунодефицита, старение [42–48].

Чтобы выжить в неблагоприятной кислородной среде, живые организмы синтезируют (эндогенные) или получают из пищи (экзогенные) различные

водорастворимые и маслорастворимые антиоксидантные соединения. Антиокислительный эффект зависит от комплекса факторов, включая природу антиоксидантов, состояние окисления, свойства окисляемого субстрата и стадию окисления. Наиболее подвержены окислению липиды, в особенности полиненасыщенные липиды. Феноменология действия антиоксидантов непосредственно связана с кинетическими особенностями процесса окисления.

Принципиальная Схема 1.1 радикально-цепного окисления липидов (RH) и многих других органических соединений включает элементарные стадии зарождения цепей, продолжения, разветвления (распад пероксидов на радикалы) и обрыва цепей, протекающего по реакциям рекомбинации или диспропорционирования свободных, в основном, пероксильных (RO_2^{\cdot}) радикалов [2–14; 28; 29]:

Схема 1.1:



Здесь I – инициатор, ROOH – гидропероксид, первичный продукт окисления, распад которого на свободные радикалы (разветвление цепей) является причиной автоускоренного развития окислительного процесса. Скорость цепной реакции пропорциональна скорости инициирования (W_i) и длине цепи (ν):

$$W = W_i \times \nu. \quad (1.1)$$

Согласно Схеме 1.1, скорость инициирования и длина цепи равны соответственно:

$$\begin{aligned}
 W_i &= 2k_0 [RH] [O_2] + 2k_i [I] + k_d [ROOH], & (1.2) \\
 \nu &= (k_p [RH] [RO_2^{\cdot}]) / 2k_t [RO_2^{\cdot}]^2,
 \end{aligned}$$

где k_d – эффективная константа скорости образования радикалов при участии ROOH. В большинстве случаев скорость зарождения цепей ($2k_o [RH] [O_2]$) намного меньше скорости их разветвления ($k_d [ROOH]$), а в инициированном окислении обычно применяют такие концентрации инициатора, при которых $W_i \cong 2k_i [I]$.

Реакции рекомбинации-диспропорционирования R^\bullet и RO_2^\bullet , а также присоединение O_2 к алкильному радикалу R^\bullet протекают с высокими значениями констант скорости: $\sim 10^5\text{--}10^9 \text{ (M} \times \text{s)}^{-1}$ практически без энергии активации. Поэтому в процессе окисления очень быстро устанавливается стационарная, кинетически равновесная концентрация этих радикалов, при которой скорости образования (W_i) и гибели радикалов практически равны. В присутствии O_2 имеет место неравенство: $[RO_2^\bullet] \gg [R^\bullet]$, и обрыв цепей происходит только при участии RO_2^\bullet :

$$W_i = 2k_t [RO_2^\bullet]^2, \text{ откуда } [RO_2^\bullet] = (W_i / 2k_t)^{0.5}. \quad (1.3)$$

Скорость окисления описывается уравнением (1.4):

$$-d[RH] / dt \cong d[O_2] / dt = W_i + k_p [RH] [RO_2^\bullet] = W_i + k_p [RH] (W_i / 2k_t)^{0.5}. \quad (1.4)$$

Отношение констант скоростей продолжения и обрыва цепи $a = k_p / (2k_t)^{0.5}$ может служить характеристикой окисляемости соединения. Окисляемость сильно зависит от строения молекулы окисляемого субстрата.

Скорость цепной реакции, как следует из уравнений (1.1) и (1.4) можно снизить, уменьшая скорость инициирования радикалов или снижая концентрацию RO_2^\bullet и длину цепи. В настоящее время известно огромное количество различных соединений антиоксидантов (АО), которые уменьшают скорости окисления и увеличивают срок службы материалов, подверженных окислению и старению, оказывают стабилизирующее действие на живые организмы. В [48] рассмотрены различные классификации антиоксидантов.

По растворимости, определяющей области функционирования и применения, выделяют масло- и водорастворимые АО. *По происхождению*, тоже влияющему на области применения, разделяют синтетические и природные АО. Природные АО обычно мало- или нетоксичны (за некоторыми исключениями), тогда как синтетические АО применяются преимущественно для стабилизации

материалов, а для применения в пищевых продуктах, косметике и медицине должны проходить жесткую проверку на токсичность, безопасность и совместимость. *По химической структуре:* среди АО выделяют соединения разных классов – фенолы, ароматические амины, полиненасыщенные каротиноиды, стабильные радикалы, серо- и фосфорсодержащие соединения; в живых организмах такие белки, как каталаза, супероксиддисмутаза и различные пероксидазы функционируют как антиоксидантные ферменты [32; 35; 37; 41; 45; 50–53]. *По механизму действия* различают следующие группы ингибиторов [28–40; 48]:

1. Обрывающие цепи по реакции с пероксирадикалами (фенолы, нафтолы, ароматические амины).

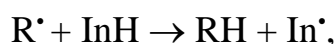
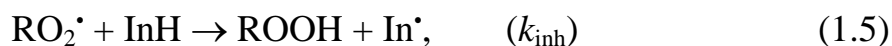
2. Ингибирующие процессы радикальной полимеризации и окисления при небольших давлениях кислорода по реакции с алкильными радикалами (хиноны, нитроксильные радикалы, нитросоединения).

3. Разрушающие гидропероксиды без образования свободных радикалов (соединения, содержащие атомы серы, фосфора, азота и др.).

4. Пассиваторы, дезактиваторы металлов.

5. Ингибиторы смешанного типа, обрывающие цепи по реакции с пероксильными или алкильными радикалами и разрушающие гидропероксиды. В большинстве своем, это полифункциональные соединения.

Ингибиторы цепной реакции (InH) увеличивают скорость обрыва цепи по реакции с радикалами, заменяя активные, ведущие цепи радикалы RO_2^{\bullet} и R^{\bullet} из окисляемого субстрата на менее активные радикалы ингибитора, которые далее реагируют только с радикалами и в некоторых случаях с субстратом или гидропероксидом в реакциях передачи цепи:



Скорость ингибированного окисления в простейшем случае, не осложненном побочными реакциями с участием ингибитора, равна:

$$W = (k_p [\text{RH}] W_i) / (f \times k_{\text{inh}} [\text{InH}]), \quad (1.7)$$

где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, показывающий, сколько обрывов цепей приходится на одну молекулу ингибитора. Если величина k_{inh} имеет вполне конкретный физический смысл и в, определенной мере, является молекулярной кинетической характеристикой реакционной способности ингибитора в реакции с RO_2^* , то стехиометрический коэффициент f представляет собой эффективную величину, которая зависит от концентраций реагентов и является совокупным результатом протекания всех реакций с участием ингибитора и продуктов его превращения.

Следует различать антирадикальную и антиокислительную активность ингибиторов. Величины k_{inh} и f характеризуют антирадикальную активность (АРА) ингибитора, т.е. его активность в реакциях с радикалами. Антиокислительная активность (АОА) – есть свойство соединения или смеси соединений замедлять окислительную деструкцию субстрата, например, уменьшать поглощение O_2 или образование пероксидов. Так, целый ряд серосодержащих соединений (тиокарбаматы, тиофосфаты), восстанавливающие пероксиды без образования радикалов, демонстрируют антиокислительное действие, но не обрывают цепи по реакции с радикалами (1.5) [54; 55], т.е. не обладают антирадикальной активностью. Вещества, ускоряющие распад гидропероксидов на свободные радикалы, и тем самым увеличивающие скорость инициирования радикалов (уравнение (1.2)), например, многие соединения переходных металлов увеличивают скорость окисления (уравнение (1.4)) [28–40] и являются прооксидантами.

Из уравнения (1.7) следует, что чем больше концентрация ингибитора и чем выше его антирадикальная активность (k_{inh} и f), тем в большей степени уменьшается скорость окисления. Кинетические характеристики антирадикального действия и их связь с особенностями строения для многих синтетических [31; 34; 36] и

природных [32; 48; 56] ингибиторов, а также способы их определения [57–59] представлены в ряде монографий и обзоров.

1.2. Серосодержащие соединения. Природные тиолы

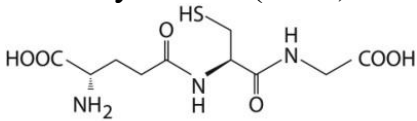
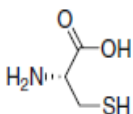
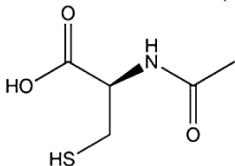
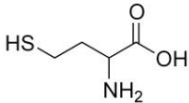
Общие сведения

Тиолы (цистеин (CSH), гомоцистеин (HSH), глутатион (GSH)) (Таблица 1.1) относятся к водорастворимым, природным, эндогенным, т.е. синтезируемым в живых клетках, серосодержащим ингибиторам [50; 52; 60–63]. Тиол-содержащие соединения играют важную роль в защите биологических систем от окислительных повреждений и известны как разрушители пероксидов [10; 63; 64]. Серосодержащие (тио-) соединения традиционно используют в антиокислительных композициях для стабилизации масел [64] и в качестве синергических добавок антипероксидного типа [65–67]. В живых организмах тиолы также действуют как антиоксиданты: взаимодействуют с гидроксильными и пероксильными радикалами, восстанавливают пероксид водорода, гидропероксиды, дисульфидные связи -S-S-, предотвращают окисление протеинов, регулируют функции белков и экспрессию генов [11; 12; 20; 68–71]. В живых организмах гидропероксиды восстанавливаются ферментами глутатионпероксидазами, которые используют GSH в качестве субстрата и эффективно восстанавливают не только H_2O_2 , но и органические гидропероксиды, включая гидропероксиды мембранных полиненасыщенных жирных кислот [72; 73].

Глутатион (GSH), трипептид, состоящий из аминокислот L-глутамата, L-цистеина и глицина в конфигурации γ -Glu-Cys-Gly - самый распространенный цитозольный тиол, присутствующий в большинстве клеток в миллимолярной концентрации (0,1–10 мМ) [74–76]. Концентрация GSH в альвеолярной слизистой оболочке ~ 0,8 мМ [77], эндоплазматическом ретикулуме ~ 2 мМ [78], эритроцитах – 2–3 мМ [74; 79], нервной ткани – 0,1–3,4 мМ [74; 80], яйцеклетках – 6–10 мМ [74],

в мозге – 1–2 мМ [81], что на порядки превосходит концентрации других компонентов защитной антиоксидантной системы [12; 68; 69; 70; 71; 82]. Большая часть клеточного глутатиона (85–90 %) синтезируется в цитозоле (1–11 мМ [77]), а также в митохондриях (5–11 мМ [77]), пероксисомах и ядерных матриксах (3–15 мМ [77]). GSH синтезируется [77; 83] в печени (4,5–8,2 мМ [74; 79; 84]) откуда поступает в плазму крови, кишечник, легкие (1,4–2,3 мМ [79; 84]) и почки (0,1–2,5 мМ [74; 79; 84]).

Таблица 1.1 – Структурные формулы природных тиолов

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Глутатион (GSH)</p>  | <p style="text-align: center;">L-цистеин (CSH)</p>  |
| <p style="text-align: center;">N-ацетилцистеин (ASH)</p>  | <p style="text-align: center;">Гомоцистеин (HSH)</p>  |

Внутри клеток глутатион умеренно стабилен, поскольку внутриклеточные пептидазы расщепляют, как правило, пептидные связи, образованные α -карбоксильными группами аминокислот, но, не γ -карбоксильными группами [85; 86]. При взаимодействии с активными формами кислорода (АФК) и другими окислителями GSH окисляется в дисульфид (GSSG). Соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона ($[GSH] / [GSSG]$) в клетке является одним из важнейших параметров, который показывает уровень окислительного стресса [87–91]. При нормальных условиях в клетке преобладает восстановленная форма GSH в соотношении 100 : 1 [74; 92]. Клеточный механизм млекопитающих поддерживает гомеостатические пулы GSH тремя различными путями, а именно: биосинтез *de novo*, усвоение GSH, полученного из экзогенных источников, через плазматическую мембрану и НАДФН-зависимое восстановление окисленного глутатиона (GSSG) через GSSG-редуктазу. Синтез GSH катализируется ферментами глутаматцистеинлигазой (GCL) и синтетазой

GSH в АТФ-зависимом биосинтетическом пути, при этом цистеин является субстратом, лимитирующим скорость синтеза GSH [74; 89]. В частности, было обнаружено, что апоптоз регулируется постоянным дисбалансом GSH / GSSG, в результате чего повышение GSSG приводит к кинетически ускоренной потере целостности митохондрий, транслокации цитокина из митохондрий в цитозоль с последующей активацией каспазы-3 [93–96]. В организме GSH участвует в процессах детоксикации электрофильных соединений (ксенобиотиков), а также в метаболизме простагландинов и лейкотриенов, регулирует функции белков и их конформации, экспрессию генов с помощью реакций тиол-дисульфидного обмена, функции лимфоцитов и иммунные реакции [96–98]. Он также участвует в транспорте аминокислот и во всасывании микроэлементов из кишечника, главным образом железа и селена [99; 100].

Несмотря на достаточно высокое содержание глутатиона в биологических жидкостях, в ряде случаев повышенное содержание природных тиолов рассматривают как биомаркер некоторых клинических ситуаций и заболеваний [100–102]: болезни Альцгеймера, Паркинсона, ревматоидного артрита и сердечно-сосудистых заболеваний. Более того, повышенный уровень GSH и CSH был отмечен в случае СПИД-деменции. У людей с аутизмом часто наблюдается множество нарушений в окислительно-восстановительной сигнализации, а повышение уровня GSSG связано со значительным снижением внутриклеточных уровней CSH, GSH и снижение в соотношении показателя GSH / GSSG. Это объясняется врожденной ошибкой в синтезе GSH и сопровождается тяжелой умственной отсталостью в младенчестве, а затем задержкой движений, атаксией и постепенным развитием прогрессирующего тремора. Нарушения в соотношении окислительно-восстановительной пары GSH / GSSG связывается с нейровоспалением [103].

В последние десятилетия обращено внимание на влияние GSH на онкологические заболевания и биохимию раковых клеток. Предполагается, что GSH является ключевым элементом в их защите от свободных радикалов и электрофилов и определяет чувствительность клеток к радиации и

медикаментозной цитотоксичности. Множественную лекарственную и лучевую резистентность опухолевых клеток по сравнению с нормальными связывают с повышенным в них уровнем GSH [95; 104–111], который раковые клетки поддерживают посредством сверхэкспрессии GSH и ферментов, ответственных за гомеостаз GSH, таких как пероксидаза GSH, редуктаза GSH, глутаредоксины и трансферазы GSH. Например, концентрация GSH в опухолях молочной железы колеблется в диапазоне 10–40 нмоль / мг белка, в то время как для здоровой ткани молочной железы это значение находится в диапазоне 1–10 нмоль / мг белка. Однако, при заболеваниях печени, диабете, лейкемии, и ряде других расстройств отмечается снижение содержания внутриклеточных тиолов [112; 113].

Цистеин (CSH), α -амино- β -тиопропионовая кислота – алифатическая серосодержащая аминокислота. L-цистеин входит в состав белков и пептидов, играет важную роль в процессах формирования тканей кожи. Цистеин участвует в образовании коллагена и глутатиона [114–117]. Цистеин окисляется значительно легче и быстрее глутатиона. Вероятно, поэтому в тканях и биологических жидкостях $[CSH] \ll [GSH]$ (μM и mM соответственно) [74; 118]. Наиболее известным белком, включающим CSH, является альбумин – основной белок плазмы [119]. Молекулярная масса альбумина около 66 кДа, концентрация в крови около 600 μM (35–50 мг / мл), что составляет большую часть всех плазменных белков (примерно 60 %) [119; 120]. Благодаря наличию единственной свободной SH-группы в положении Cys34, альбумин формирует наибольший тиоловый пул в крови [121], который относят к антиоксидантам. В плазме здоровых взрослых 70–80% альбумина содержат свободную сульфгидрильную группу, 25 % остатков цистеина Cys34 формируют дисульфиды с другими цистеинами, глутатионом или гомоцистеином. Соотношение свободных и связанных в дисульфиды сульфгидрильных групп Cys34 в [122] предлагается рассматривать как показатель окислительного стресса наряду с соотношением $[GSH] / [GSSG]$.

Гомоцистеин (HSH) – непротеиногенная аминокислота, гомолог аминокислоты цистеина, от которого отличается одной метиленовой группой $-\text{CH}_2-$ (Таблица 1.1.). Гомоцистеин – эндогенный тиол, он не поступает с пищей, а

синтезируется из метионина удалением терминальной метильной группы. Повышенный уровень в крови гомоцистеина (гипергомоцистеинемия) указывает на нехватку фолиевой кислоты и витамина В₁₂ в организме и может привести к ишемической болезни сердца, тромбозу и психоневрологическим заболеваниям [123–129]. В течение жизни уровень гомоцистеина в крови постепенно повышается от 5 μM у детей до 10–11 μM у взрослых. У людей с повышенным уровнем гомоцистеина повышается риск возникновения болезни Альцгеймера и старческого слабоумия [130]. Авторы [131] отмечают, что фенольный антиоксидант кверцетин смягчает отрицательный эффект гомоцистеина, индуцирующего окислительный стресс [129].

N-ацетилцистеин (ASH), в англоязычной литературе – NAC) – синтетический тиол, ацетилированный вариант L-цистеина, является источником сульфгидрильных групп и промежуточным звеном в синтезе глутатиона из цистеина. С 1970-х его применяют для лечения отравлений парацетамолом [132; 133]. Токсичность парацетамола, в основном, связана с истощением в организме запасов глутатиона и накоплением промежуточных продуктов метаболизма парацетамола, обладающих гепатотоксическим действием, а именно образованием из парацетамола в системе микросомальных ферментов цитохрома P450 *N*-ацетил-*p*-бензохинонимина (NAPQI). Исторически ASH приобрел известность как муколитическое и противовоспалительное средство, с конца 1980-х гг. ASH использовали в качестве лечебного препарата, который подобно GSH способен восстанавливать дисульфидные связи в белках и оказывать как прямое антиоксидантное действие, обусловленное наличием свободной группы -SH, так и не прямое – за счёт стимуляции биосинтеза глутатиона [134; 135]. Пандемия 2020 и 2021 гг. в определенной степени подняла уровень актуальности исследований биохимических реакций эндогенного тиола глутатиона (GSH) и, в особенности, синтетического *N*-ацетилцистеина, который использовали в лечении начальных стадий COVID-19 [136–139]. Имеются отрывочные данные о заметных терапевтических эффектах ASH в условиях, характеризующихся снижением GSH

или окислительным стрессом, таких как ВИЧ-инфекция, рак, болезни сердца и курение сигарет [107; 134; 135; 139–143].

ASH является более эффективным восстановителем дисульфидов белка в реакциях тиол-дисульфидного обмена [144] по сравнению с CSH и GSH, т.к. скорость этой реакции напрямую связана с нуклеофильностью тиолата, которая уменьшается в ряду: $AS^- > GS^- > CS^-$ [145]. В случае ASH *N*-ацетильный остаток и карбоксильная группа делокализуют высокую электронную плотность тиолата, тем самым увеличивая нуклеофильный характер ASH. В [146] показано, что нуклеофильная часть тиолата ASH разрывает дисульфидные связи и остается связанной с более основным атомом серы, тем самым вытесняя более кислую тиольную группу. В этом заключается определенный защитный механизм, поскольку кислые тиолы, которые легко окисляются до дисульфидов, также легко восстанавливаются нуклеофильными молекулами.

Высокая реакционная способность ASH в реакциях тиол-дисульфидного обмена обуславливает его применение как муколитического препарата, разрушающего дисульфидные мостики в муцине, основном белке, образующим гель (слизь) в условиях окислительного стресса при воспалительных заболеваниях легких [147; 148]. Непрямой муколитический эффект ASH состоит в стимуляции биосинтеза GSH из эндогенного цистеина [149].

Необходимо отметить, что низкомолекулярные природные тиолы глутатион и цистеин [150; 151] применяются в дерматологии и косметологии как осветляющие и омолаживающие средства благодаря влиянию на уровень меланина. GSH является коммерчески доступным и входит в состав отбеливающих средств для умывания и кремов для лица [152–155], успешно используется в качестве лекарственных средств, БАДов и в виноделии [156–158], а также в таргетной терапии в составе систем доставки лекарств при онкологических заболеваниях [159–163].

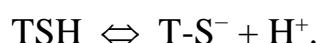
Физико-химические свойства глутатиона и природных тиолов

Методами рентгеноструктурного анализа, ИК- и КР-спектроскопии, и компьютерным моделированием показано, что GSH кристаллизуется в орторомбической системе, в элементарной ячейке которой содержится четыре молекулы GSH S-образной формы. Они связаны между собой сложной трехмерной межмолекулярной сетью водородных связей (Рисунок 1.1) [164–167].

Большой радиус и, как следствие, более низкая электроотрицательность атома серы в значительной степени определяют реакционную способность тиолов и дисульфидов по сравнению с их кислородными аналогами. Связь S-H значительно менее полярна, чем связь O-H, и тиолы связаны между собой более слабой межмолекулярной водородной связью по сравнению со спиртами. Длина связи S-H, составляющая около 1,33 Å (для O-H – 0,96 Å) обуславливает повышенную кислотность тиолов и легкость их окисления до дисульфидов [167].

Методами ИК-, КР- и ЯМР-спектроскопии, а также молекулярным моделированием исследованы конформационные свойства и водородные связи в молекуле глутатиона в водном растворе. Моделирование показало, что GSH обладает высокой гибкостью в водном растворе с переходами в расширенное, «полусвернутое» и «свернутое» состояния при любом pH. Причем молекулы воды могут легко разрушать «свернутую» конформацию глутатиона [168–171].

Тиолы (TSH) могут диссоциировать с образованием тиолат-анионов:



И TSH, и T-S⁻ являются нуклеофилами, но отличаются по свойствам и реакционной способности. Термодинамический параметр тиоловой группы – $pKa = -\lg Ka$, где Ka – константа равновесия, определяет относительное содержание тиолат-анионов в различных буферных системах при разных pH. pKa изменяется в зависимости от pH среды и от расположения тиоловых групп в определенной белковой среде [172]. Молекула GSH включает две карбоксильных, сульфгидрильную и аминную группы. CSH, HSH и ASH в отличие от GSH в своем составе содержат лишь одну карбоксильную группу (Таблица 1.1). pKa для этих тиолов представлены в Таблице 1.2. Согласно [173] при pH 7,4 из каждых 100 молекул тиола в тиолатной

форме находится 12, 3,7 и 0,7 для CSH, GSH и ASH, соответственно. Следует отметить, что некоторые химические и биохимические различия между CSH и ASH, и, в частности, антиоксидантные и восстановительные свойства, хорошо объясняются отличиями в значениях pK_a (Таблица 1.2). В частности, пониженная кислотность SH-группы ASH, с одной стороны, делает его более устойчивым к окислению воздухом и в реакциях с другими окислителями, а с другой стороны, объясняет его более высокую восстанавливающую способность в реакциях тиол-дисульфидного обмена по сравнению с CSH [173].



Рисунок 1.1 – Две возможных конформации глутатиона: а – расширенная, б – свернутая [171]

Примечательно, что в отличие от других тиолов для глутатиона имеет место большой разброс в значениях pK_{a1} , характеризующих диссоциацию по связи S-H [174–179]. В обзоре [180] отмечается, что тиольные группы, связанные с углеродом (RSH), являются ключевыми реакционноспособными функциональными группами в биологических системах. Мягкий анион тиолата (RS^-) является мощным нуклеофилом, который образует комплексы с катионами мягких металлов, такими как Hg (II), Cu (I), Ag (I) и Au (I). В клетке белковые и небелковые тиолы проявляют широкий диапазон реакционной способности с кажущимися значениями pK_a , как правило, от 7,5 до 9,5, иногда около 5 [181] и, в исключительных случаях, 3,5 для тиолрегулирующей тиолтрансферазы [182]. RSH-группа цистеина имеет $pK_a \sim 8,2$ [178]. Низкие значения pK_a возникают, когда анион тиолата стабилизируется путем образования водородной связи с гидроксильной или аминогруппой [181; 183].

Некоторые оболочки бактериальных клеток также содержат кислые сульфгидрильные протоны со значениями pK_a 3,6–4,1 [184].

В работе [185] проведено теоретическое исследование реакционной способности и селективности различных свободных радикалов при взаимодействии с остатками цистеина, встроенными в пептидную цепь, участок

Таблица 1.2 – Значения pK_a низкомолекулярных тиолов

| Тиол | pK_a (CO ₂ H) | pK_{a1} (SH) | pK_{a2} (NH ₃ ⁺) | Ссылки |
|--------------|----------------------------|----------------|---|----------------|
| GSH | 2,5; 3,7 | 9,2 | 9,5 | [74; 175; 177] |
| | | 8,83 | | [173] |
| | | 9,42 ± 0,17 | | [178] |
| CSH | 1,92 | 8,22 ± 0,16 | 10,46 | [177; 178] |
| | | 8,3 ± 0,2 | | [74; 173; 179] |
| | | 8,35 | | [176] |
| HSH | 2,22 | 8,87 | 10,86 | [176] |
| ASH (NAC) | 3,14 ± 0,05 | 9,52 | – | [173] |
| | | 9,43 ± 0,07 | | |

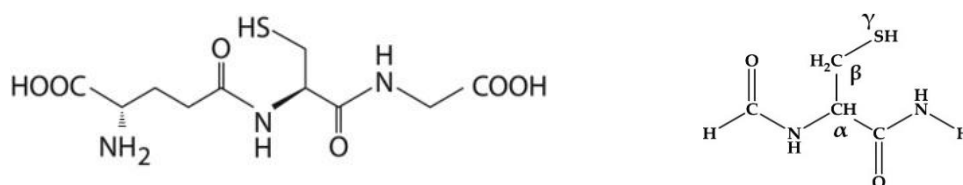


Рисунок 1.2 – Структура глутатиона и *N*-формилцистеинамида

которой моделировали *N*-формилцистеинамидом (Рисунок 1.2). Авторы обратили внимание на обрамление цистеиновой сульфгидрильной группы в глутатионе пептидными карбонильными группами и предположили, что в радикальных реакциях отрыва (переноса) атома H (HT) от исходного цистеинового остатка и в реакциях переноса единичного электрона (SET) с тиолат-аниона с последующим переносом протона это обстоятельство может иметь значение для термодинамики и кинетики процесса.

Радикалы могут оторвать атом Н от молекулы *N*-формилцистеинамида в положении γ – от группы SH, в положении β – от метиленовой группы и в положении α – от третичной связи -СН (Рисунок 1.2). В Таблице 1.3 сопоставлены Энергии Гиббса (ΔG° , ккал \times моль⁻¹, как в [185]) в водной и липидной средах для реакций отрыва атома водорода (НТ) кислородными радикалами от *N*-формилцистеинамида в положениях α , β и γ . Реакции алкоксильных радикалов $\cdot\text{OH}$ и $\cdot\text{OCH}_3$ экзергонические (exergonic), с близкими величинами ΔG° для α и γ реакций в обеих средах, т.е. активные алкоксирадикалы могут реагировать с цистеиновым фрагментом в белках и в глутатионе и отрывать водород по нескольким реакционным центрам.

Таблица 1.3 – Энергии Гиббса (ΔG° , ккал \times моль⁻¹) в водной и липидной средах для реакций отрыва атома водорода (НТ) радикалами от *N*-формилцистеинамида при 298,15 К [185]

| Радикал | α (вода) | β (вода) | γ (вода) | α (липид) | β (липид) | γ (липид) |
|----------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| $\cdot\text{ДФПГ}$ | 9,46 | 17,91 | 8,68 | 6,12 | 15,30 | 5,73 |
| $\cdot\text{OH}$ | -33,13 | -24,68 | -33,92 | -33,71 | -24,53 | -34,10 |
| $\cdot\text{OCH}_3$ | -18,15 | -9,70 | -18,93 | -18,48 | -9,30 | -18,87 |
| $\cdot\text{OOH}$ | -0,57 | 7,87 | -1,36 | -0,69 | 8,49 | -1,08 |
| $\cdot\text{OOSH}_3$ | 0,76 | 9,21 | -0,02 | -0,46 | 8,72 | -0,85 |

Кинетика и механизм взаимодействия тиолов с активными формами кислорода

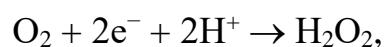
Образование свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) таких как гидропероксиды (ROOH) и (H₂O₂), пероксильные радикалы разных типов (RO₂ \cdot , O₂ \cdot^- , HO₂ \cdot) в результате биохимических окислительно-восстановительных реакций является частью нормального клеточного метаболизма. Стационарные уровни АФК необходимы для ряда физиологических процессов, включая фосфорилирование белка, активацию транскрипционного фактора, дифференцировку клеток, регуляции фагоцитоза и апоптоза, клеточного иммунитета, а также в качестве вторичных мессенджеров в регуляции

функционирования клеток сердца и сосудов [186–189]. Повышенное содержание АФК свидетельствует об окислительном стрессе [190–193] и отражает дисбаланс между скоростями образования АФК и их утилизацией антиоксидантной системой защиты (антиокислительными ферментами и низкомолекулярными антиоксидантами) организма путем восстановления пероксидов и образования с радикалами неактивных в процессе окисления продуктов [194–196]. В норме баланс образования и нейтрализации АФК поддерживается системой ферментов антиоксидантного действия и низкомолекулярных биоантиоксидантов, таких как токоферолы, полифенолы, аскорбиновая кислота, глутатион. Развитие представлений об окислительном стрессе (ОС), проявления ОС и взаимосвязь с различными заболеваниями наглядно представлены в работах профессора Сиеса (H. Sies [42–44; 197]).

АФК могут повреждать различные биологические молекулы: липиды (стимулируя пероксидное окисление липидов и повреждение мембран), ДНК (приводя к разрывам ДНК) и белки (окисляя различные аминокислоты и инактивируя ферменты). В настоящее время считается, что окислительный стресс сопровождает патогенез ряда заболеваний и состояний, от старения до воспаления и канцерогенеза, если не в качестве основной причины заболевания, то, по крайней мере, в качестве отягчающего фактора. Недавно было высказано предположение, что окислительный стресс может играть важную роль в определении сердечных осложнений при COVID-19 [198].

Наиболее повреждающими и опасными свободными радикалами во многих патологических состояниях являются активные кислородные радикалы супероксид-анион $O_2^{\cdot-}$ и гидроксильный радикал [185].

В аэробных организмах в процессе дыхания молекулярный кислород (O_2) может быть восстановлен до пероксида водорода и воды [197]:



Основным источником клеточного гидроксильного радикала являются реакции Фентона ионов Fe^{2+} с H_2O_2 или при взаимодействии соединений

переходных металлов с H_2O_2 или гидропероксидами [199–201]. $\text{O}_2^{\cdot-}$ образуется через окисление арахидоновой кислоты липоксигеназами и циклооксигеназами [29; 32; 40]. В эукариотических клетках внутриклеточный уровень $\text{O}_2^{\cdot-}$ регулируется активностью двух основных ферментов супероксиддисмутаз – Cu/Zn-SOD и Mn-SOD. Эти ферменты катализируют дисмутацию $\text{O}_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 и O_2 [186]. В дополнение к этой основной реакции Cu/Zn-SOD, как известно, катализирует с разной степенью эффективности несколько окислительно-восстановительных побочных реакций с использованием альтернативных субстратов, включая биологические тиолы, все с участием ионов меди в активном центре фермента. Известно, что доступность и реакционная способность каталитического сайта повышаются при неправильном сворачивании фермента, структурных изменениях, вызванных мутацией или стрессами окружающей среды, что вызывает окисление различных тиоловых соединений, включая CSH, которое сопровождается образованием H_2O_2 [202; 203]. Отмечают, что GSH устойчив к окислению, катализируемому Cu/Zn-SOD. Показано, что в присутствии небольших количеств CSH или цистина, глутатион становится мощным прооксидантом, который ускоряет CSH-зависимое образование H_2O_2 , восстанавливая цистин обратно в CSH. Такая активность GSH может истощать его запасы, тем самым уменьшая клеточный антиоксидантный потенциал [80; 200; 204].

Исторически со времени открытия природного тиола в 1921 г., названного глутатионом [8], основной функцией этого тиола считали ферментативное восстановление пероксида водорода и гидропероксидов липидов клеточных мембран. К исследованию реакций глутатиона, цистеина и цистеинсодержащих белков и других серосодержащих эндогенных соединений с радикалами приступили позже. Теория жидкофазного свободно-радикального окисления углеводов и липидов, кинетика и механизм действия катализаторов и ингибиторов, теория ингибированного окисления, связывающая строение ингибиторов с их реакционной способностью в реакциях с радикалами, была разработана для реакций в органической среде [28–41]. Только в 1960-е годы научная общественность с трудом приняла возможность существования радикалов в живых

клетках. Работы Н. М. Эмануэля [1–6] и D. Harman [205; 206] были одними из первых работ в области исследования радикальных реакций в живых системах и поиска путей и способов влияния на эти реакции.

Эндогенные тиолы – гидрофильные соединения и функционируют только в водной среде. По этой причине глутатион практически не влияет на окисление масел. В работе [20] проведено сравнительное исследование реакционной способности тиолов цистеина (CSH), глутатиона (GSH) и гомоцистеина (HSH) в реакциях с разными радикалами гальвиноксидом (GO), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилом (DPPH), и с пероксильными радикалами (rO_2^\cdot), образующимися при распаде водорастворимого азоинициатора в атмосфере воздуха. В реакциях с GO и DPPH активность тиолов, которую оценивали по скорости расходования стабильных радикалов при одинаковых концентрациях реагентов, увеличивается в ряду:



Относительную активность тиолов в реакции с пероксильными радикалами оценивали методом конкурирующих реакций с использованием двух красителей флуоресцеина и пирогаллола красного (PGR) в качестве конкурирующего акцептора радикалов. В этих экспериментах тиолы продемонстрировали активность, превышающую антирадикальную активность красителей: добавки тиолов приводили к четким периодам индукции в расходовании красителей, на основании которых авторы смогли оценить только стехиометрический коэффициент ингибирования для тиолов, который оказался меньше 1. При использовании липофильных красителя и инициатора в мицеллярной среде додецилсульфата натрия, тиолы практически не оказывали влияния на скорость расходования липофильного красителя. Это позволило заключить, что тиолы, присутствующие в водной фазе, не могут эффективно перехватывать радикалы, присутствующие в липофильном домене.

Реакции тиолов с супероксид анион-радикалом $\text{O}_2^{\cdot-}$ исследовали в серии работ [10; 12–16]. Первоначально предполагалось, что тиолы не реагируют с $\text{O}_2^{\cdot-}$, а эффективное ингибирование имеет место в сочетаниях тиолов с

супероксиддисмутазой [14]. Но затем, отметив и проведя анализ большого разброса данных о реакциях $O_2^{\cdot-}$ с глутатионом (опубликованные константы скорости отличались на порядки от 10 до 10^5 ($M \times c)^{-1}$), авторы пересмотрели своё отношение к активности $O_2^{\cdot-}$ [11; 16] и оценили величину константы скорости реакции $O_2^{\cdot-}$ с GSH: $k \sim 10^2$ ($M \times c)^{-1}$. В работах [44; 51] было обращено внимание на то, что реакции глутатиона и других тиолов серного пула *in vitro* обычно проводят в буферных растворах при pH 7,0–7,4. Близкие результаты по активности радикалов в реакциях с разными тиолами указывают на то, что реакция тиолов с радикалами происходит по механизму переноса единичного электрона (SET) с последующем присоединением протона. С другой стороны, расчеты показывают, что доля тиолат-аниона ($\chi = [TS^-] / [TSH]_0$), который образуется в результате кислотной диссоциации связи S-H при pH 7,4 невелика:

$$\begin{aligned} TSH &\Leftrightarrow TS^- + H^+; & K_a &= ([TS^-] [H^+]) / [TSH]; \\ [TSH] &= [TSH]_0 - [TS^-]; \\ \chi &= [TS^-] / [TSH]_0 = K_a / ([H^+] + K_a). \end{aligned} \quad (1.9)$$

При pH 7,4 $[H^+] = 3,98 \times 10^{-8}$ М. И, если принять для цистеина $pK_a = 8,3$ (см. Таблицу 1.2), получаем: $\chi = 0,11$.

В работе [185] наряду с теоретическими расчетами термодинамических параметров реакций отрыва атома водорода из разных положений молекулы цистеина, в составе пептида (см. Таблицу 1.2) проведено теоретическое исследование реакционной способности и селективности различных свободных радикалов, в том числеДФПГ и кислородных радикалов, при взаимодействии с остатками цистеина, в различных средах по механизмам НТ и SET.

В Таблице 1.4 представлены результаты расчетов, согласно теории активированного комплекса энергии Гиббса и энтальпии активации, а также термические и диффузионные константы скорости реакций отрыва атома водорода в липидной среде от связи -SH (γ) и от третичной связи C-H (α) (См. Рисунок 1.2). Видно, что для всех радикалов отрыв атома Н от связи -SH является предпочтительным.

В Таблице 1.5 сопоставлены энергии активации Гиббса в липидной и водной среде, а также расчетные термические и диффузионные константы скорости для реакций с переносом электрона в водной среде. Из сравнения данных Таблиц 1.4 и 1.5 следует, что в водной среде реакции тиолов с радикалами будут происходить преимущественно по механизму SET – переноса электрона. При этом наблюдаемая активность тиолов в реакциях с радикалами возрастает с ростом pH среды.

Таблица 1.4 – Энергии Гиббса ($\Delta^\circ G_{\text{HT}}^\ddagger$, ккал \times моль $^{-1}$) и энтальпии активации ($\Delta^\circ H_{\text{HT}}^\ddagger$, ккал \times моль $^{-1}$), термические константы скорости (k , М $^{-1} \times$ с $^{-1}$) и диффузионные константы скорости (k_D , М $^{-1} \times$ с $^{-1}$) для реакций отрыва атома водорода (HT) в липидной среде радикалами от *N*-формилстеинамида в α и γ положении при 298,15 К [185]

| Радикал | | $\Delta^\circ G_{\text{HT}}^\ddagger$ | $\Delta^\circ H_{\text{HT}}^\ddagger$ | k , М $^{-1} \times$ с $^{-1}$ | k_D , М $^{-1} \times$ с $^{-1}$ |
|--------------------|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| •ОН | α | 4,65 | 0,13 | $3,18 \times 10^9$ | $1,71 \times 10^9$ |
| | γ | 4,29 | -0,57 | $4,45 \times 10^9$ | $1,65 \times 10^9$ |
| •ОСН ₃ | α | 9,86 | 2,94 | $1,34 \times 10^6$ | – |
| | γ | 8,19 | 0,73 | $1,24 \times 10^7$ | |
| •ООН | α | 22,87 | 14,63 | $3,98 \times 10^{-2}$ | – |
| | γ | 16,06 | 9,02 | $5,55 \times 10^2$ | |
| •ООСН ₃ | α | 21,91 | 12,66 | 0,834 | – |
| | γ | 14,21 | 6,40 | $6,57 \times 10^3$ | |

Тиильные радикалы, образующиеся в реакции тиолов со свободными радикалами, обладают рядом особенностей: 1. Тиильные радикалы могут обратимо присоединяться к ненасыщенным связям, катализируя тем самым *цис-транс* изомеризацию ненасыщенных кислот [207–209]. Появление информации о вредном воздействии *транс*-липидов на здоровье человека [210; 211] привлекло дополнительное внимание к тиильным радикалам [212; 213]. Образование S-центрированного радикала тиильного радикала глутатиона в реакциях с трет-бутоксильным радикалом или токофероксильным радикалом было подтверждено методом ЭПР с использованием спиновой ловушки 4-пиридил-1-оксид трет-бутилнитрона (POBN) [21; 214]. 2. Тиильные радикалы быстро, с почти диффузионной константой скорости, рекомбинируют с образованием дисульфида:



3. Тиольные радикалы могут инициировать тиол-ен реакции с ненасыщенными соединениями. Реакции тиолов с олефинами (тиол-ен реакции, гидротиолирование алкенов) с образованием тиоэфиров известны давно с 1905 г. [215]. Но в последние десятилетия им уделяется большое внимание в связи с возможностью селективного и стереоселективного синтеза разнообразных соединений в полимерной и медицинской химии [26; 216–221].

Таблица 1.5 – Энергии активации Гиббса ($\Delta^\circ G_{\text{SET}}^\ddagger$, ккал \times моль⁻¹) в липидной и водной среде, термические константы скорости (k , М⁻¹ \times с⁻¹) и диффузионные константы скорости (k_D , М⁻¹ \times с⁻¹) для SET реакций в водной среде при 298,15 К [185]

| Радикал | $\Delta^\circ G_{\text{SET}}^\ddagger$ (липид) | $\Delta^\circ G_{\text{SET}}^\ddagger$ (вода) | k , М ⁻¹ \times с ⁻¹ | k_D , М ⁻¹ \times с ⁻¹ |
|--------------------|---|--|--|--|
| •ДФПГ | 59,66 | 1,97 | $2,23 \times 10^{11}$ | $7,65 \times 10^9$ |
| •ОН | 92,76 | 0,78 | $1,67 \times 10^{12}$ | $8,03 \times 10^9$ |
| •ОСН ₃ | 105,65 | 0,00 | $6,21 \times 10^{13}$ | $7,71 \times 10^9$ |
| •ООН | 110,29 | 5,73 | $3,92 \times 10^8$ | $7,83 \times 10^9$ |
| •ООСН ₃ | 111,67 | 3,77 | $1,07 \times 10^{10}$ | $7,59 \times 10^9$ |

Кинетика и механизм реакции тиолов с пероксидом водорода

Пероксид водорода (H₂O₂) впервые был получен из пероксида бария Л. Ж. Тенаром в 1818 г. [222; 223]. В большом обзоре L. Flohé [223] H₂O₂ и функционально связанный с ним блок ферментов пероксидаз, глутатионпероксидаз и редуктаз рассматриваются как основной химический скелет редокс процессов в живых организмах («Life science means redox science») и биокатализе. К. Ф. Шенбейн в 1863 г. опубликовал статью о том, что различные ткани растений и животных превращают бесцветные настойки фенола гваякола в синие с помощью H₂O₂ [224] и классифицировал это явление как каталитическое окисление, поэтому в настоящее время его считают первооткрывателем пероксидаз (EC 1.11.1. ...).

Пероксид водорода используется в синтезе новых лекарственных средств и является основным биологически активным видом кислорода, образующимся в качестве побочного продукта в дыхательной цепи и конечного продукта

многочисленных метаболических реакций [17; 189; 197; 223–226]. H_2O_2 относится к активным формам кислорода (ROS, АФК), но в отличие от кислородных радикалов в условиях *in vitro* растворы H_2O_2 достаточно стабильны. Тем не менее, в живых системах локальные концентрации H_2O_2 невелики: концентрация H_2O_2 в крови и плазме примерно 1–5 μM [227–229], внутриклеточная концентрация H_2O_2 в печени составляет около 0,01 μM [18].

В обзорах [16; 17; 197; 223; 226] рассмотрены пути образования и утилизации H_2O_2 в биологических объектах. Основным источником H_2O_2 является дисмутация анион-радикалов супероксида, образующегося в результате 1-электронного восстановления кислорода [17; 199; 226]:



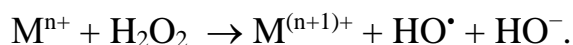
Эту реакцию катализируют супероксиддисмутазы. Среди источников супероксида выделяются NAD(P)H-оксидазы, действующие под контролем факторов роста и цитокинов [230]. Источником H_2O_2 в клетках могут быть ферментативные реакции пероксисомных ферментов, такие как ацил-СоА-оксидаза, полиаминоксидаза и оксидаза D-аминокислот [231–233], которые восстанавливают кислород до H_2O_2 при окислении их субстратов.

Метаболическая утилизация H_2O_2 согласно [226] происходит в каталитических ферментативных реакциях, осуществляемых каталазой и многочисленными пероксидазами. Кроме того, возможна диффузия H_2O_2 от источника, даже через мембраны, во внеклеточное пространство или в другие клетки. Каталитическая ферментативная реакция, т.е. расщепление H_2O_2 на H_2O и O_2 , может рассматриваться как предохранительный клапан, возникающий в токсичных условиях при более высоких концентрациях H_2O_2 .

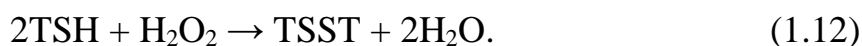
Однако, кинетический анализ, представленный в обзоре [19], показал, что пероксиредоксины и глутатионпероксидазы в подавляющем большинстве являются предпочтительными мишенями для H_2O_2 в клетках. Исследования с локализованными зондами показывают, что H_2O_2 может вырабатываться в клеточных микродоменах и потребляться перечисленными высокореперативными мишенями прежде, чем он сможет распространиться в другие части клетки.

Кинетические данные указывают на то, что окисление регуляторных тиоловых белков непосредственно пероксидом водорода требует облегченного механизма или опосредования через высокореакционные сенсоры. Тот же вывод относится к низкомолекулярным тиолам. Глутатион, несмотря на высокую концентрацию в клетках, восстанавливает гидропероксиды и H_2O_2 только вместе с глутатионпероксидазами как субстрат этих ферментов.

H_2O_2 является слабым одноэлектронным окислителем, ($E'_0 = 0,32 \text{ В}$). Однако одноэлектронный продукт восстановления, гидроксильный радикал ($\text{HO}\cdot$), является одним из самых сильных известных окислителей ($E'_0 = 2,31 \text{ В}$). Его реакции имеют очень низкий энергетический барьер активации и протекают со скоростью близкой к диффузионной. Одноэлектронное восстановление H_2O_2 происходит при взаимодействии с соединениями переходных металлов:

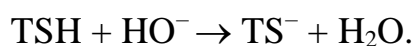
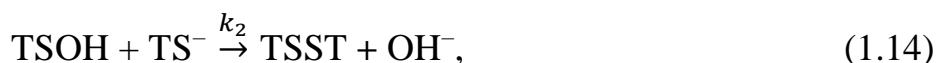


H_2O_2 – довольно сильный двухэлектронный окислитель ($E'_0 = 1,32 \text{ В}$), однако в отличие от других АФК H_2O_2 непосредственно не реагирует с большинством биомолекул, включая такие низкомолекулярные антиоксиданты, как фенолы, в том числе известные биоантиоксиданты токоферолы и флавоноиды. Это связано с высоким энергетическим барьером активации. Однако H_2O_2 может напрямую взаимодействовать и окислять тиолы. Известно, что в отсутствие ферментов реакция восстановления H_2O_2 природными тиолами (TSH) сопровождается образованием дисульфида и воды согласно брутто-уравнению [10; 12; 112; 234; 235]:



Однако в ряде работ отмечается, что несмотря на общую простую стехиометрию согласно уравнению (1.12), скорость имеет первый порядок по концентрациям реагентов [10; 12; 16; 22; 112] и зависит от состава среды, pH и соотношения концентраций GSH и H_2O_2 [22]. Детальные исследования механизма этой реакции свидетельствуют о сложности процесса, который протекает через образование промежуточного комплекса $[\text{TSH} - \text{H}_2\text{O}_2]$ [22; 236] и ряда последовательных и параллельных стадий [22].

В [237] прямым ЭПР исследованием было показано, что в диапазоне рН 6–12 в реакции цистеина и глутатиона с H_2O_2 радикалы не образуются. Исследование кинетики реакции тиолов с H_2O_2 в атмосфере азота в диапазоне рН 6–12 при 0–35 °С дало следующие физико-химические показатели для глутатиона и цистеина: энергия активации (E_a) – 46,9 и 51,0 кДж / моль; ΔH_a – 44,4 и 48,5 кДж / моль; ΔS_a – –75,3 и –58,6 Дж / (моль × К), соответственно [237]. В [25] E_a для реакции цистеина с H_2O_2 при рН 6 и диапазоне температур 0–50 °С получена равной 70,96 кДж / моль и по уравнению Эйринга рассчитаны $\Delta H_a = 68,7$ кДж / моль и $\Delta S_a = 7,1$ Дж / (моль × К). Считается, что эта реакция протекает по механизму кислотно-катализируемой нуклеофильной атаки ($\text{S}_{\text{N}2}$) и реакция не радикальная, т.к. реакции пероксидов, протекающие радикальным путем, часто имеют иные параметры активации. Поскольку механизм кислотно-катализируемой нуклеофильной атаки состоит в гетеролитическом расщеплении кислородно-кислородной связи пероксида водорода с выделением либо гидроксидного иона, либо воды в качестве выходящей группы, большинство исследовательских групп [10; 237; 238] пришли к выводу, что механизм реакции тиолов с H_2O_2 представляет собой двухступенчатое нуклеофильное замещение с промежуточным образованием лабильной сульфеновой кислоты (TSH) [25]:



Лимитирующей стадией является реакция (1.13) тиолат-аниона с H_2O_2 , концентрация которого определяется величиной K_a – константы кислотной диссоциации связи -SH: $\text{TSH} \Leftrightarrow \text{TS}^- + \text{H}^+$ [239]. H_2O_2 является очень слабой кислотой с pK_a 11,6. Поэтому при физиологическом рН H_2O_2 остается в недиссоциированном состоянии. Анион (HOO^-) является сильным нуклеофилом, но его реакции ограничены высоким pK_a . Продукты реакции – дисульфид (TSSH) и вода согласно стехиометрическому уравнению (1.12).

Поскольку скорость реакции определяется концентрацией тиолат-аниона, сравнительная реакционная способность тиолов обусловлена величиной pK_a сульфгидрильной (-SH) группы. При физиологических условиях при pH 7,4 в тиолах цистеине (CSH), гомоцистеине (HSH), глутатионе (GSH) и *N*-ацетилцистеине (ASH) в соответствии с их pK_a ионизируется только 10, 3, 1,6, 0,8 % от свободных форм и их активность в реакции с H_2O_2 уменьшается в ряду: CSH > HSH > GSH > ASH [173].

Для реакции цистеина с пероксидом водорода в диапазоне концентраций 0,01–2,3 мМ в 0,05 М водном фосфатном буфере, в диапазоне pH 4–13 при 25 °С в отсутствие ионов металлов в кислородной и безкислородной среде были определены k_1 и k_2 равные $14,7 \pm 0,35$ и 570 ± 170 (М × с)⁻¹, соответственно; при 37 °С $k_1 = 42,6$ (М × с)⁻¹ [25]. Близкие значения для k_1 для цистеина получены в [238] – $12,4$ (М × с)⁻¹ в диапазоне pH 6–12 при 25 °С, а также в [231] – $17,1 \pm 0,5$ (М × с)⁻¹ при 37 °С. В [10] 26 (М × с)⁻¹ для цистеина, 22 (М × с)⁻¹ – для глутатиона и 19 (М × с)⁻¹ – для *N*-ацетилцистеина при 37 °С и pH 7,4.

На скорость реакции тиолов с пероксидом водорода не влияет ионная сила раствора (I) в диапазоне $0,05 \text{ М} < I < 0,4 \text{ М}$ [25; 241]. Авторы [25] отмечают, что кислород воздуха не влияет на скорость реакции H_2O_2 с цистеином при 25 °С и pH 6,0, а в случае глутатиона в [242] установлено, что скорость образования дисульфида увеличивается в присутствии кислорода.

Анализ литературы о продуктах реакции тиолов с H_2O_2 показывает, что в подавляющем большинстве работ получают дисульфид и воду. В [243] методом масс-спектрометрии найдено, что после 90 минут реакции при pH 3,9 в 200-кратном избытке H_2O_2 глутатион окисляется до сульфоновой кислоты GSO_3H , но при pH 7,2 – мгновенно окисляется до дисульфида GSSG. В серии работ [23; 24; 166; 234; 241] приводятся достаточно убедительные результаты спектроскопических (УФ и ИК) исследований и теоретического анализа [23] промежуточного образования комплексов $[GSH - H_2O_2]$ и $[ASH - H_2O_2]$ не только в буферных растворах с физиологическим pH, но и в чистой воде [245], когда образуется кислая реакционная смесь с pH 2. В [24; 244] рамановским и временным

рамановским рассеянием наблюдали GSH в виде относительно протяженной структуры с полярными участками в водном растворе, сольватированными молекулами воды. Добавление H_2O_2 к раствору GSH или ASH изменяет сольватационное состояние карбоксилатов и аммониевых групп. Эти функциональные группы могут быть специфическими участками для стабилизации H_2O_2 в комплексе [TSH – H_2O_2]. Гораздо более слабая константа скорости, полученная для накопления GSSG при pH 2 ($2 \times 10^{-3} (\text{M} \times \text{c})^{-1}$), по сравнению с pH 7 ($0,2 (\text{M} \times \text{c})^{-1}$ [24; 166]), когда все карбоксилатные группы депротонированы, также подтверждает эту гипотезу. Показано также сродство TSST к H_2O_2 . H_2O и H_2O_2 конкурируют друг с другом, чтобы сольватировать карбоксильные, аминную, а также и амидную группы. TSST способен предотвращать токсичное действие H_2O_2 благодаря способности этого димера к установлению специфических H-связей с этим окислителем. Константа равновесия образования комплексов [GSH – H_2O_2] и [ASH – H_2O_2] при pH 7,0 – $K = 2000 \pm 700 (\text{M} \times \text{c})^{-1}$ и [166] и $K = 900 \pm 100 (\text{M} \times \text{c})^{-1}$ [231], соответственно.

В [245] исследовали влияние состава минеральных электролитов водных растворов на кинетику окисления глутатиона (GSH) и цистеина (CSH) в соответствующие им дисульфиды. Авторы показали, что в обычной водопроводной воде скорости окисления значительно выше, чем в сверхчистой воде. Систематическое изучение различных компонентов электролита показало, что особенно CaCl_2 увеличивает скорость окисления GSH. Однако этот эффект не наблюдается для CSH, что указывает на особую чувствительность глутатиона к ионному составу среды в реакциях с АФК.

Заключение

Тиолы оказывают многофакторное влияние на клеточный окислительно-восстановительный метаболизм, антиоксидантную защиту и передачу сигналов. Эндогенные тиолы, в особенности глутатион, синтезируются в больших количествах и выполняют разнообразные функции в животных и растениях, применяются в косметике, медицине, производстве пищевых продуктов,

функционируют в водно-солевых средах при разных рН. В обзоре [246], рассмотрен вопрос могут ли окислительно-восстановительные системы на основе тиола использоваться в качестве компонентов для приложений синтетической биологии. Синтетическая биология возникла в последние десятилетие на основе подходов молекулярной биологии и инженерии и направлена на разработку новых, биологически вдохновленных систем для промышленных и фундаментальных применений, начиная от биокомпьютеров и заканчивая производством лекарств. Авторы отмечают, что включение тиолов в биологические системы дает возможность разнообразить функциональные свойства создаваемых объектов. Но для конструирования необходима количественная информация о реакционной способности и деталях механизмов реакций тиолов с активными формами кислорода с учетом состава среды.

В настоящее время такой системной информации нет. Поэтому поставленная цель выявить кинетические закономерности и механизм реакций гидрофильных тиолов (эндогенных глутатиона, гомоцистеина, цистеина и синтетического ацетилцистеина) с пероксильными радикалами и пероксидом водорода в деионизированной воде, исследовать процесс генерирования радикалов при взаимодействии тиолов с H_2O_2 и инициирование цепных тиол-ен реакций тиолов с фенолами, содержащими ненасыщенную связь в боковой цепи; выяснить влияние рН среды на скорости этих реакций и предложить следующий из экспериментальных данных кинетически обоснованный механизм реакций тиолов с активными формами кислорода является актуальной и перспективной.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Реактивы

Тиолы: глутатион (GSH, «Fluka», «Sigma-Aldrich», «Acrosorganics»), гомоцистеин (HSH, «Sigma-Aldrich»), цистеин (CSH, «Acrosorganics»), L-ацетилцистеин (ASH, «Acrosorganics»).

Фенолы: транс-ресвератрол (RVT, «abcrgmbh»), кофейная кислота (CA, «Sigma-Aldrich»)

Источники радикалов:

1. ААРН – водорастворимый азоинициатор 2,2'-азобис (2-амидинопропан) гидрохлорид («Fluka»). В атмосфере воздуха при распаде ААРН в водной среде генерируются третичные пероксильные радикалы (Рисунок 2.1):

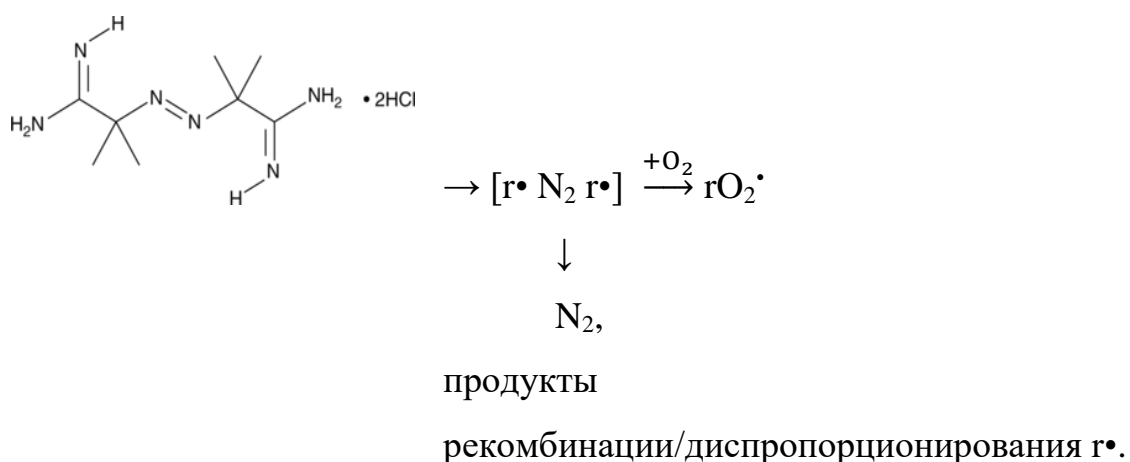


Рисунок 2.1 – Образование пероксильных радикалов из ААРН в атмосфере воздуха в водной среде

Период полураспада ААРН при 37 °С и нейтральных рН составляет около 175 часов. Скорость инициирования радикалов (W_i) при распаде ААРН равна:

$$W_i = k_i [\text{ААРН}], \quad (2.1)$$

где k_i – константа скорости инициирования радикалов с учетом клеточного эффекта, которая при 37 °С равна $k_i = 1 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ [6; 245].

2. В органической среде использовали инициатор азо-бис-изобутиронитрил (AIBN). Скорость инициирования при распаде инициатора равна $W_i = 2e \times k_0 [\text{AIBN}]$, где $2e \times k_0 = 1,2 \times 1,58 \times 10^{15} \exp(-129000 / RT) \text{ c}^{-1}$ [31; 248].

3. SOTS-1 (ди-(4-карбоксибензил) гипонитрит; 4,4'-[азобис(оксиметилен)]бис-бензойная кислота, «Саuman chemical company» – азосоединение, которое согласно [249], можно использовать как источник супероксид анион-радикалов (Рисунок 2.2):

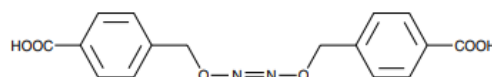


Рисунок 2.2 – Структурная формула SOTS-1 [249; 250]

Период полураспада SOTS-1 в водных растворах при 37 °C и $\text{pH} \geq 7$ составляет 4900 секунд. Супероксид анион-радикалы образуются в результате диффузионно контролируемых реакций первичных анион-радикалов с кислородом при $\text{pH} \geq 7$: [250]:

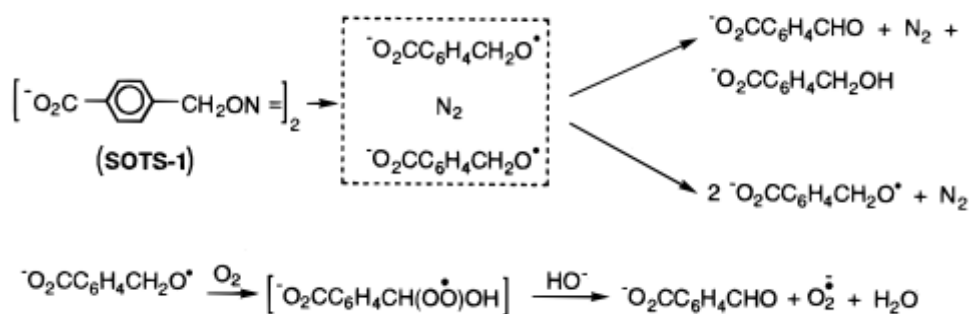


Рисунок 2.3 – Образование супероксид анион-радикалов из SOTS-1 при $\text{pH} \geq 7$ [249]

4. Пероксид водорода, H_2O_2 («PanReasAppliChem»). H_2O_2 устойчив и не образует радикалов в деионизированной воде, однако при комнатной и физиологической температуре генерирует радикалы при взаимодействии с переходными металлами [28; 32], катионными поверхностно-активными веществами и ацетилхолином [243; 251]. В данной работе установлено и исследовано образование радикалов при взаимодействии H_2O_2 с тиолами.

Реактив для определения концентрации тиолов

Реактив Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), DTNB, «Sigma-Aldrich»).

Акцепторы радикалов

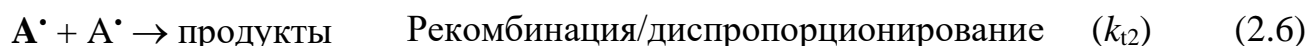
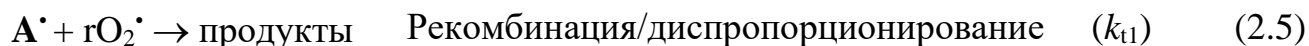
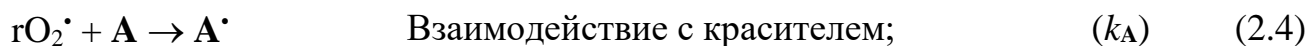
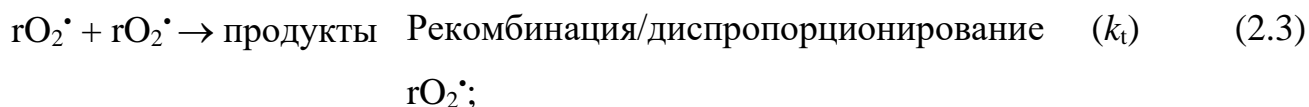
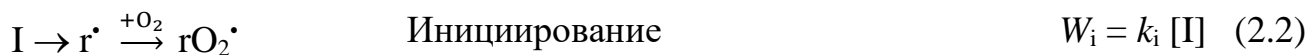
Для изучения скоростей образования радикалов в реакциях тиолов с пероксидами необходим водорастворимый акцептор радикалов, который в многокомпонентной системе должен перехватывать все генерируемые радикалы и быть инертным по отношению к остальным компонентам системы. В органических средах удобным универсальным акцептором является полиеновый углеводород β -каротин [252; 253]. Поэтому поиск удобного акцептора радикалов был проведен среди анионных **A** и **C** и катионных **B** и **D** полиметиновых красителей с относительно короткой полиметиновой цепочкой и высокими коэффициентами экстинкции (ϵ), которые были взяты из коллекции цианиновых красителей Госниихимфотопроект (Таблица 2.1). Все красители реагируют с радикалами со скоростью инициирования. Но в присутствии H_2O_2 устойчив только краситель **A**, который не расходуется и не изменяет спектр поглощения в течение, по крайней мере, нескольких часов. Было также показано, что спектр поглощения **A** не изменяется в присутствии тиолов.

Таким образом, в качестве акцептора радикалов был использован краситель **A** (пиридиновая соль 3,3'-ди- γ -сульфопропил-9-метилтиакарбо-цианин бетаина); его спектральные характеристики: $\epsilon = 0,77 \times 10^5 \text{ (M} \times \text{cm)}^{-1}$ при $\lambda_{\text{max}} = 546 \text{ nm}$.

Кинетические характеристики **A**, как акцептора радикалов, (константа скорости взаимодействия с пероксильными радикалами $k_A = 5,4 \times 10^4 \text{ (M} \times \text{s)}^{-1}$ и стехиометрический коэффициент $f = 1$) были определены в экспериментах, представленных на Рисунках 2.4 а, б, в.

Кинетическая Схема 2.1 взаимодействия красителя **A** с радикалами rO_2^{\cdot} , образующимися при распаде инициатора (I) в атмосфере кислорода, включает следующие реакции [31; 32; 34]:

Схема 2.1:



В отсутствие акцептора устанавливается стационарная концентрация радикалов, равная $[rO_2 \cdot] = (W_i / 2k_t)^{0.5}$. В присутствии акцептора утилизация радикалов $rO_2 \cdot$ происходит в реакциях (2.3)–(2.5) и $W_i = 2k_t [rO_2 \cdot]^2 + k_A [rO_2 \cdot] [A] + k_{t1} [rO_2 \cdot] [A \cdot]$. При достаточно высокой концентрации акцептора, практически все образующиеся радикалы $rO_2 \cdot$ реагируют с акцептором, и скорость его расходования пропорциональна скорости инициирования радикалов:

$$-d[A] / dt = W_i / f, \quad (2.7)$$

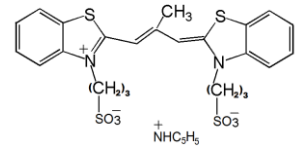
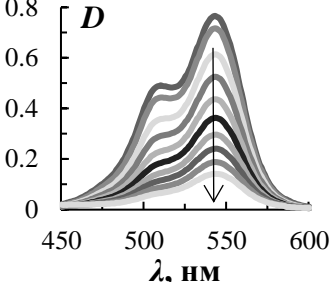
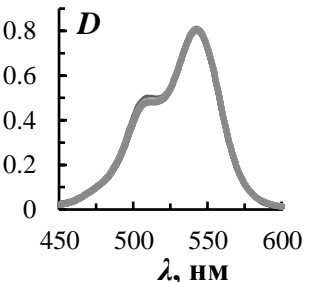
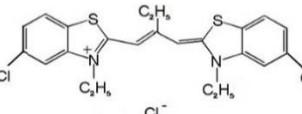
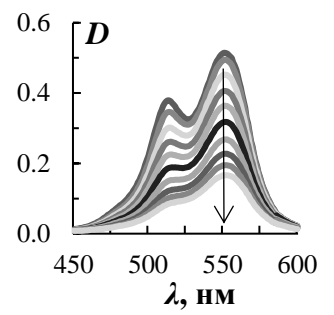
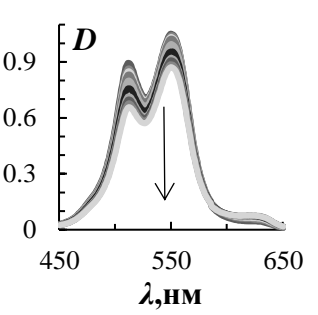
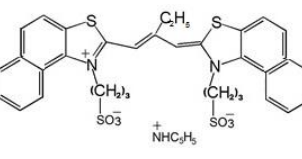
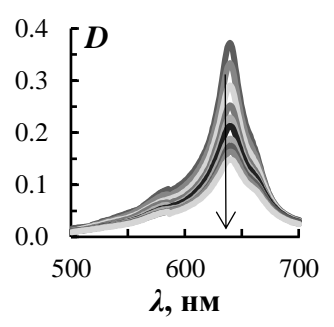
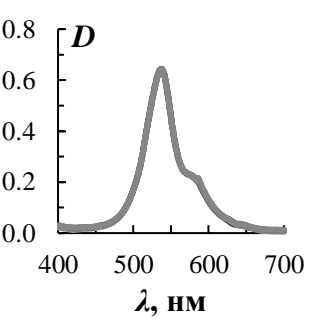
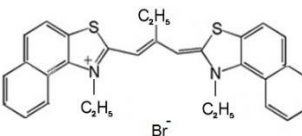
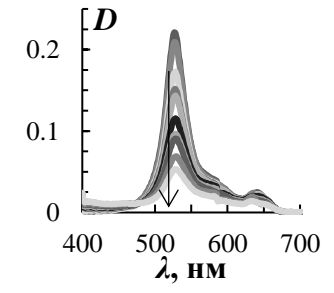
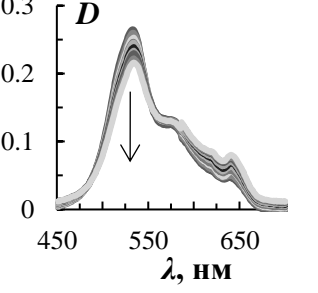
где f – стехиометрический коэффициент, показывающий сколько $rO_2 \cdot$ в сумме, реагирует с одной молекулой A . Величина f в значительной степени зависит от соотношения k_{t1} и k_{t2} . Если доминирует перекрестная реакция (k_{t1}), то $f = 2$; если преобладает (k_{t2}) – диспропорционирование радикалов $A \cdot$, образующихся из акцептора, то $f = 1$. Из неравенства $k_A [rO_2 \cdot] [A] \gg 2k_t [rO_2 \cdot]^2$ можно оценить концентрацию акцептора, необходимую для подавления квадратичной гибели радикалов $rO_2 \cdot$, $[A] \gg 2k_t [rO_2 \cdot] / k_A$ или $[A] \gg (2k_t W_i)^{0.5} / k_A$. На Рисунке 2.4а представлен этот режим расходования A . Скорость расходования красителя пропорциональна скорости уменьшения оптической плотности (D) в максимуме поглощения:

$$-d[A] / dt = (-dD / dt) / \varepsilon. \quad (2.8)$$

Из Рисунка 2.4а видно, что концентрации акцептора $[A] \geq 2 \times 10^{-6}$ М достаточно для подавления квадратичной гибели радикалов $rO_2 \cdot$, иницируемых со скоростью

$\sim 2 \times 10^{-8} \text{ M} \times \text{c}^{-1}$, а из равенства $(-dD / dt) / \varepsilon = k_i [I]$, т.е. $-d[A] / dt = W_i$ следует, что $f = 1$.

Таблица 2.1 – Изменение спектров поглощения полиметиновых красителей при взаимодействии с радикалами, образующимися при распаде 18 мМ ААРН и с 20 мМ H_2O_2 в водной среде, при 37 °С; [краситель] = 0,006 мМ; спектры записаны с интервалом 1 мин [254]

| | Формулы красителей | Водный раствор, ААРН | Водный раствор, H_2O_2 |
|----------|---|---|---|
| A |  |  |  |
| B |  |  |  |
| C |  |  |  |
| D |  |  |  |

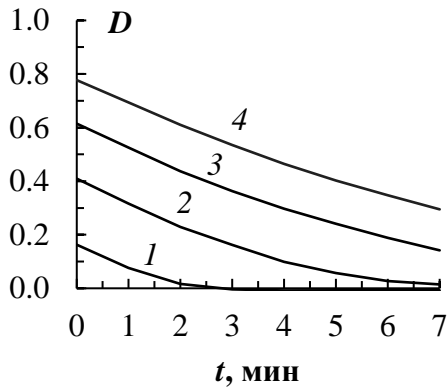


Рисунок 2.4а – Расходование А при взаимодействии с радикалами, инициируемыми 18 мМ ААРН в воде, 37 °С; $[A] \times 10^5$ М: 1 – 0,21; 2 – 0,53; 3 – 0,8; 4 – 1,01

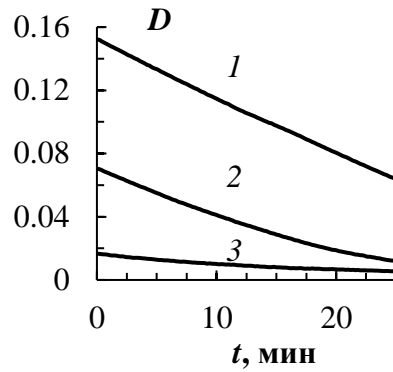


Рисунок 2.4б – Расходование А при взаимодействии с радикалами, инициируемыми 55 мМ ААРН в воде, 37 °С; $[A] \times 10^5$ М: 1 – 0,2; 2 – 0,1; 3 – 0,03

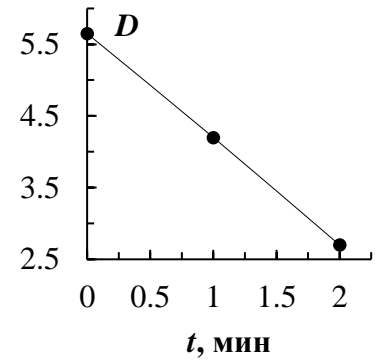


Рисунок 2.4в – Зависимость начального наклона полулогарифмических анаморфоз кинетических кривых Рисунка 2б ($tg\varphi$) от $[A_0]$

Константа взаимодействия А с пероксильными радикалами (k_A) была определена из кинетических кривых расходования А при больших скоростях инициирования радикалов и при малых концентрациях акцептора, когда $[A] \rightarrow 0$ (Рисунки 2.4б и в). В этом случае гибель радикалов rO_2^* происходит, в основном при их диспропорционировании $|d[A] / dt| \ll W_i$ и концентрация радикалов стремится к $[rO_2^*] \rightarrow (W_i / 2k_t)^{0,5}$, а $|-d[A] / dt| \rightarrow k_A(W_i / 2k_t)^{0,5} [A]$ при $[A] \rightarrow 0$. Кривые 1–3 линеаризуются в полулогарифмических координатах, а тангенс угла наклона анаморфоз увеличивается с уменьшением $[A_0]$ (Рисунок 2.4б), достигая предельного значения $k_A(W_i / 2k_t)^{0,5} = 5,65 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ при $[A] = 0$. При распаде ААРН в атмосфере кислорода образуются третичные пероксильные радикалы. В работе [255] определено значение константы скорости рекомбинации для третичных 1,1-диметилпропил-пероксильных радикалов в воде, равное $5,2 \times 10^4 \text{ (М} \times \text{с)}^{-1}$. Приняв по аналогии, что $2k_t = 5 \times 10^4 \text{ (М} \times \text{с)}^{-1}$, оценили значение $k_A = 5,65 \times 10^{-2} / (W_i / 2k_t)^{0,5} = 5,4 \times 10^4 \text{ (М} \times \text{с)}^{-1}$.

Другие вещества, использованные в работе

Ацетилхолин хлорид (AChCl) «Sigma-Aldrich».

Нитроксильный радикал TEMPO (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил) оксил) «Sigma-Aldrich».

Спиновая ловушка 5,5-Диметилпирролин-N-оксид (DMPO, «Abcam», UK).

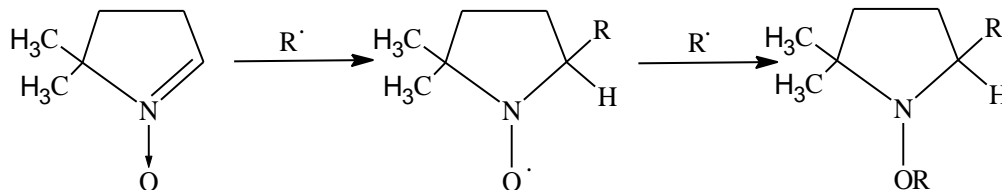


Рисунок 2.5 – Структура спин-ловушки DMPO и химические реакции, в которых участвует спин-ловушка и ее аддукты

Соли для приготовления буферов и растворов электролитов:

NaH₂PO₄·2H₂O («Labkem»), Na₂HPO₄·12H₂O, KH₂PO₄, K₂HPO₄·3H₂O – все «PCGroup», NaCl и KCl («Компонент-реактив»).

Растворители

Бидистиллированная (поверхностное натяжение $\sigma = (72,6 \pm 0,5)$ мДж / м², удельная электропроводность $\chi = 5,5 \times 10^{-5}$ Ом⁻¹ × см⁻¹) и деионизированная вода (Direct-Q UV Millipore, 18 Мом × см, поверхностное натяжение $\sigma = (72,6 \pm 0,5)$ мДж / м², удельная электропроводность $\chi = 5,5 \times 10^{-5}$ Ом⁻¹ × см⁻¹). Для приготовления базовых растворов фенолов использовали этанол («Медхимпром») и диметилсульфоксид («ACS, PanReac»).

2.2. Методика проведения эксперимента и методы анализа

Спектрофотометрический метод (Кинетическая спектрофотометрия)

Электронные спектры поглощения исследуемых соединений регистрировали на спектрофотометрах Ultraspec1100Pro («Amersham plc», США) и «СФ-2000» (ООО «ОКБ Спектр», Россия) в области 200–700 нм с использованием кварцевых кювет толщиной 1 см. Кинетические кривые распада малых концентраций полиметинового красителя А регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-3101РС ЦКП «Новые материалы и технологии» Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН. Реакции проводили непосредственно в

термостатируемых кюветах или в стеклянной термостатируемой ячейке, снабженной устройствами для отбора проб и барботажом воздухом при физиологической температуре ($37 \pm 0,5$ °C). Из ячейки отбирали пробы (5–90 мкл) по ходу реакции для анализа содержания компонентов. Аликвоты добавляли соответственно к 3 мл деионизированной воды (для анализа фенолов) и натрий-фосфатного буферного раствора PBS, pH 7,4, содержащего 0,3 мМ DTNB (для анализа тиолов), и записывали УФ-спектры.

Спектральные характеристики анализируемых соединений:

Тиолы быстро реагируют с дисульфидом DTNB и высвобождают 2-нитро-5-тиобензойную кислоту, ионная форма которой при pH > 7 окрашена в желтый цвет:

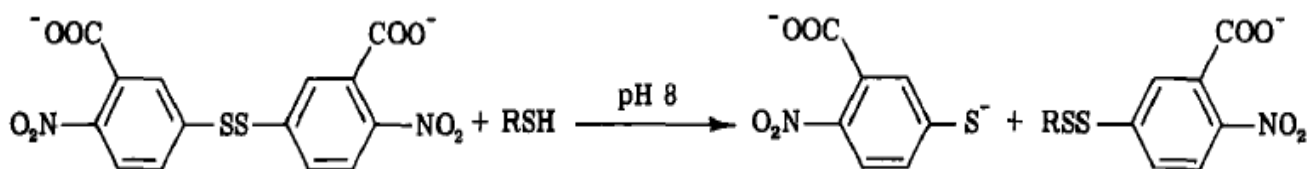


Рисунок 2.6 – Образование 2-нитро-5-тиобензойной кислоты в реакции тиолов с DTNB [117; 256–259]

Реакция протекает стехиометрически, что позволяет спектрофотометрически определять концентрацию тиола: при $\lambda_{\text{max}} 412$ нм $\varepsilon = 0,14 \times 10^5$ (М × см)⁻¹ [117; 256–259].

Ресвератрол: при $\lambda_{\text{max}} = 304\text{--}308$ нм; $\varepsilon = 0,3 \times 10^5$ (М × см)⁻¹.

Кофейная кислота: $\lambda_{\text{max}} = 325$ нм; $\varepsilon = 0,14 \times 10^5$ (М × см)⁻¹.

Йодометрический метод

Наиболее распространенный йодометрический метод определения перекисей основан на восстановлении перекисного кислорода йодистым калием в кислой среде:



И последующем титровании выделившегося йода тиосульфатом натрия:



pH-метрия

Поскольку исследуемые в работе тиолы содержат карбоксильные группы, которые могут оказывать влияние на pH реакционной смеси, измерение pH растворов исследуемых систем измеряли до и после введения тиолов в реакционную смесь на pH-метре-милливольтметре pH-410 «Аквилон» с использованием стеклянного лабораторного комбинированного электрода ЭСЛК-01.7. Ошибка в измерении pH составляла $\pm 0,02$.

Масс-спектрометрия

Исследования молекулярных продуктов реакции проводили методом масс-спектрометрии в Центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН на тандемном масс-спектрометре LTQ FT Ultra (ThermoFinnigan, Бремен, Германия) методом электроспрейной ионизации в режиме измерения положительных ионов. Непосредственно перед вводом в масс-спектрометр образец разбавляли в 20 раз 50 % раствором ацетонитрила с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты.

ЭПР-спектрометрия

ЭПР спектры X-диапазона для исследования взаимодействия TEMPO с GSH и H₂O₂ регистрировали на спектрометре «Радиопан» (Польша).

Спектры ЭПР X-диапазона для исследования спин-аддукта, образующегося при взаимодействии DMPO с радикалами, образующимися в реакции GSH с H₂O₂, были записаны на спектрометре Bruker EMX (Германия) в Центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН. Микроволновая мощность во избежание эффектов насыщения была не более 2 мВт. При записи спектров амплитуда модуляции 100 кГц всегда была существенно меньше наименьшей ширины резонансной линии. Для определения магнитно-резонансных параметров ЭПР линий и моделирования спектров использовали программы WINEPR и SIMFONIA.

Микрокалориметрия

Кинетику тепловыделения в реакции тиолов с пероксидом водорода измеряли методом изотермической калориметрии на приборе ДАК-1-1 (ООО ТД “Аналитические приборы”, Россия) при 37,7 °С (Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка).

Хемилюминесценция

Антирадикальную активность маслорастворимых антиоксидантов определяли хемилюминесцентным методом в модельной реакции окисления этилбензола, инициированного АИБН (азо-бис-изобутиронитрил), при 50 °С аналогично [58; 59]. АИБН очищали двукратной перекристаллизацией из этанола. Константу скорости реакции АШН и RVT с пероксильным радикалом этилбензола определяли по тангенсу угла наклона касательной ($tg\varphi$) к кинетической кривой ХЛ на подъеме свечения после израсходования ингибитора в точке перегиба [58; 59]:

$$k_{inh} = \frac{\sqrt{2k_t} \times tg\varphi}{\sqrt{W_i} \times 0,273}, \quad (2.11)$$

где W_i – скорость инициирования за счет распада АИБН; $2k_t = 1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$ – константа скорости диспропорционирования пероксильных радикалов этилбензола.

Статистическая обработка данных и компьютерное моделирование

Для обработки экспериментальных результатов использовали пакет программ MSOffice 2010. Кинетическое компьютерное моделирование проводили по программе для ЭВМ «Кинетика 2012 – программа для расчета кинетических параметров химических и биохимических процессов», разработанная А. В. Соколовым, С. В. Поповым, Е. М. Плиссом и Д. В. Лошадкиным: Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности «Программы для ЭВМ. Базы данных. Топологии интегральных микросхем», № 3, опублик. 20.03.2013 и по программе для численного моделирования кинетики сложных химических реакций Kinet для Windows версия 0.8 © 2009–2019 А.В. Абраменков.

Результаты представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение ($X \pm S.D.$), по крайней мере, десяти независимых экспериментов, которые в тексте указывали для эмпирических усредненных по многим опытам параметров. На рисунках и в таблицах приведены значения скоростей, ошибка в измерении которых была, как правило, составляла 10% и не превышала 15%.

Глава 3. Кинетические характеристики взаимодействия природных тиолов и фенолов с пероксильными радикалами

Антиоксидантные свойства соединений в значительной степени зависят и определяются их реакционной способностью при взаимодействии с пероксильными и иными радикалами. В данной главе представлены результаты определения кинетических характеристик реакций водорастворимых тиолов глутатиона, цистеина, гомоцистеина и *N*-ацетилцистеина, а также ресвератрола – растительного фенола, содержащего ненасыщенную связь в боковой цепи, с пероксильными радикалами.

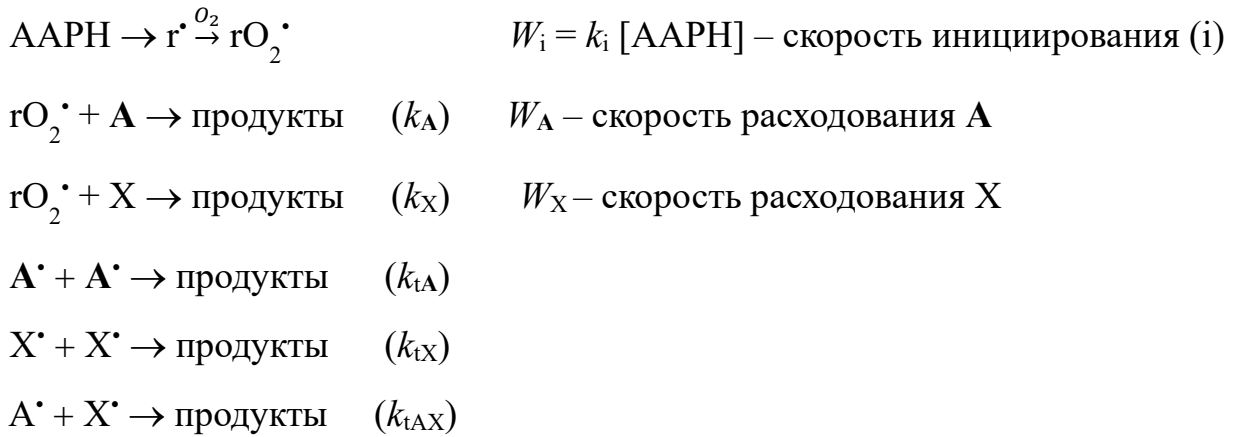
3.1. Кинетические характеристики взаимодействия тиолов с пероксильными радикалами

Тиолы практически не растворяются в органических растворителях, поэтому исследование их антирадикальной активности проводили в реакциях с пероксильными радикалами, образующимися при распаде водорастворимого инициатора ААРН в водном растворе в аэробной среде. Оценку величины константы скорости реакции тиолов с пероксильными радикалами проводили методом конкурирующих реакций с акцептором А.

Из Рисунка 3.1 следует, что при постоянной скорости инициирования радикалов скорость расходования акцептора уменьшается при добавках тиолов глутатиона (GSH), гомоцистеина (HSH), цистеина (CSH) и *N*-ацетилцистеина (ASH), т.е. тиолы действуют как конкурирующие акцепторы радикалов.

Кинетическая Схема 3.1 расходования двух конкурентных акцепторов радикалов А и Х (тиолы) включает в себя инициирование радикалов (i) со скоростью инициирования $W_i = k_i [AAPH]$, их взаимодействие с двумя акцепторами А и Х и квадратичную гибель в реакциях рекомбинации и/или диспропорционирования радикалов, образующихся из акцептора А[•], и конкурирующего акцептора Х[•].

Схема 3.1:



Реакции рекомбинации/диспропорционирования радикалов A^\bullet и X^\bullet , протекают с высокими скоростями [31; 260] и обеспечивают для акцептора A и тиолов стехиометрические коэффициенты $f = 1$ в реакциях с пероксильными радикалами. В стационарных условиях при достаточных концентрациях акцептора имеет место равенство $W_i = W_A + W_X$, из которого следует, что

$$[\text{rO}_2^\bullet] = W_i (k_A [\text{A}] + k_X [\text{X}]). \quad (3.1)$$

Скорость расходования A при добавке X равна:

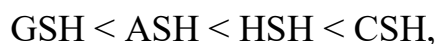
$$W_A = k_A [\text{A}] [\text{rO}_2^\bullet] = (k_A [\text{A}] W_i) / (k_A [\text{A}] + k_X [\text{X}]). \quad (3.2)$$

Для анализа экспериментальных данных удобно трансформировать уравнение (3.2) в вид (3.3):

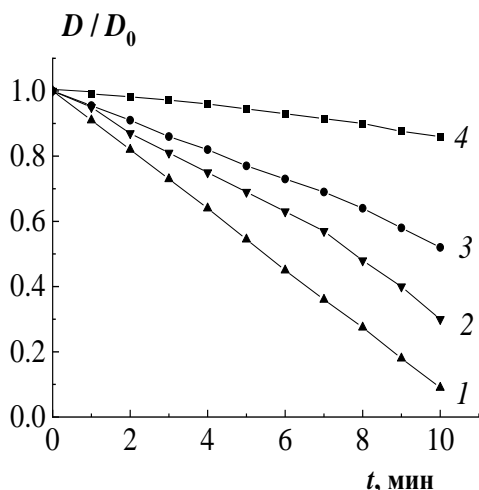
$$1 / W_A = \{1 + (k_X / k_A) ([\text{X}] / [\text{A}])\} / W_i. \quad (3.3)$$

В Таблице 3.1 представлены экспериментально полученные значения начальных скоростей расходования красителя A при добавках тиолов GSH, HSH, CSH и ASH при различных соотношениях концентраций тиола и акцептора. Эти данные линейризуются в координатах уравнения (3.3) $1 / W_A - [\text{X}] / [\text{A}]$ (Рисунок 3.2). Наклон полученных зависимостей равен $\text{tg}\varphi = (k_X / k_A) / W_i$, следовательно, $k_X = \text{tg}\varphi \times k_A \times W_i$.

Таким образом, для тиолов в водном растворе при 37 °С величины константы скорости реакции с пероксильными радикалами, образующимися при распаде AAPH в аэробных условиях, увеличиваются в ряду:

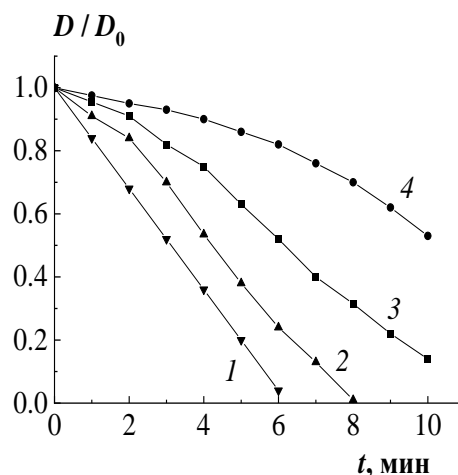


Глутатион



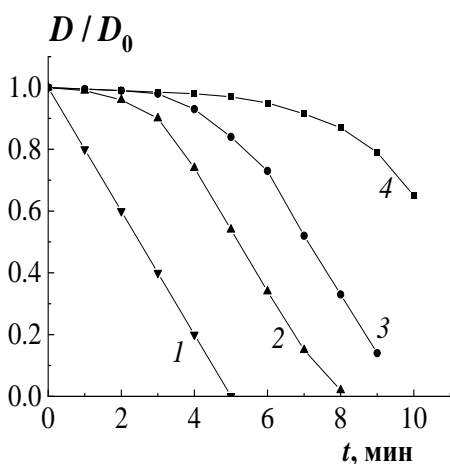
а) $[AAPH] = 15 \text{ mM}$; $[A] = 10 \text{ μM}$;
 $[GSH]$ в μM : 1 – 0; 2 – 4; 3 – 10; 4 – 40

Гомоцистеин



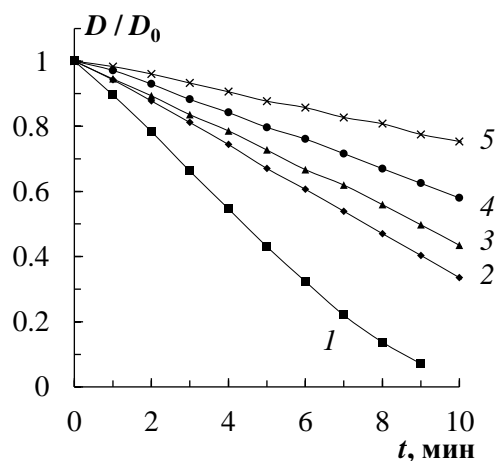
б) $[AAPH] = 18 \text{ mM}$; $[A] = 6,5 \text{ μM}$;
 $[HSH]$ в μM : 1 – 0; 2 – 2,5; 3 – 4; 4 – 13

Цистеин



в) $[AAPH] = 18 \text{ mM}$; $[A] = 5,6 \text{ μM}$;
 $[CSH]$ в μM : 1 – 0; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4

N-ацетилцистеин



г) $[AAPH] = 18 \text{ mM}$; $[A] = 10 \text{ μM}$;
 $[ASH]$ в μM : 1 – 0; 2 – 4; 3 – 7; 4 – 10;
 5 – 25

Рисунок 3.1 – Влияние добавок тиолов на скорость расходования акцептора А при взаимодействии с радикалами, образующимися при распаде ААРН в водной среде, 37 °С

и равны соответственно в $10^5 \text{ (M} \times \text{s)}^{-1}$: глутатион – 0,84; N-ацетилцистеин – 1,6; гомоцистеин – 2,2; цистеин – 4,4. По величине k_X тиолы можно отнести к ингибиторам средней силы [29; 31; 40; 41]. Наиболее высокую активность в ряду тиолов проявляет цистеин [261].

Таблица 3.1 – Влияние тиолов на скорость расходования красителя **A** в реакции с радикалами, образующимися при распаде ААРН

| Глутатион, [ААРН] = 15 мМ; [A] = 10 μМ | | | Гомоцистеин, [ААРН] = 18 мМ; [A] = 6,5 μМ | | |
|---|---------|----------------------------------|---|---------|----------------------------------|
| [Тиол], μМ | [A], μМ | $W_A, 10^8$ $M \times c^{-1}$ | [Тиол], μМ | [A], μМ | $W_A, 10^8$ $M \times c^{-1}$ |
| 0 | 10 | 1,5 | 0 | 6,5 | 1,8 |
| 4 | 10,1 | 1,4 | 2,5 | 6,8 | 0,7 |
| 10 | 9,9 | 0,97 | 4 | 6,5 | 0,55 |
| 40 | 10 | 0,33 | 13 | 6,6 | 0,22 |
| Цистеин, [ААРН] = 18 мМ; [A] = 5,6 μМ | | | N-ацетилцистеин, [ААРН] = 18 мМ; [A] = 10 μМ | | |
| 0 | 5,4 | 1,8 | 0 | 10 | 1,8 |
| 2 | 5,8 | 0,27 | 4 | 10 | 1,3 |
| 3 | 5,4 | 0,18 | 7 | 10 | 1,0 |
| 4 | 5,7 | 0,12 | 10 | 8 | 0,54 |
| 11,2 | 5,6 | 0,055 | 25 | 9 | 0,3 |

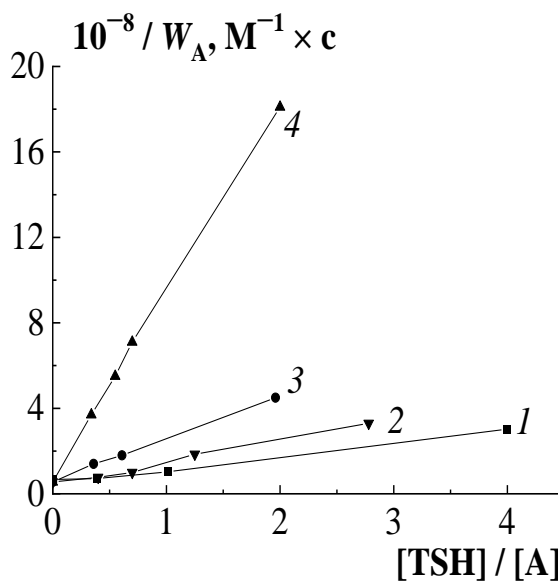


Рисунок 3.2 – Зависимости скорости расходования красителя **A** (W_A) от концентраций GSH (1), ASH (2), HSH (3) и CSH (4) в координатах уравнения (3.3). Условия такие же, как на Рисунке 3.1

3.2. Кинетические характеристики взаимодействия ресвератрола с пероксильными радикалами

Транс-ресвератрол, RVT, (3,5,4'-тригидроксистильбен) известен как фитоалексин, который в относительно больших количествах присутствует в винограде и красных винах (Рисунок 3.3). В последние годы RVT широко применяется в косметологии, фармацевтике и пищевых добавках [262–268]. RVT хорошо растворяется в органических растворителях, но из спиртовых растворов может быть растворен в воде вплоть до миллимолярных концентраций. На Рисунке 3.4 приведены изменения в спектрах поглощения ресвератрола отдельно (Рисунок 3.4а) и вместе с акцептором А (Рисунок 3.4б) в водном растворе ААРН. Из рисунков видно, что можно контролировать как расходование RVT в ходе реакции с радикалами, так и влияние RVT на скорость расходования А [269].

На Рисунке 3.5 представлены практически параллельные кинетические кривые расходования RVT, взятого при разных начальных концентрациях. Согласно теории [31; 32; 34] независимость скорости расходования фенола (акцептора свободных радикалов) от начальной концентрации свидетельствует о том, что в этой области концентраций все радикалы, генерируемые инициатором, акцептируются фенолом. При этом скорость расходования фенола (PhOH) равна:

$$-d[\text{PhOH}] / dt = W_i / f, \quad (3.4)$$

где f – стехиометрический коэффициент, показывающий, сколько $\text{rO}_2\cdot$ в сумме реагирует с одной молекулой PhOH.

Согласно данным Рисунка 3.5 скорость расходования RVT $W_{\text{RVT}} = 9,1 \times 10^{-9} \text{ М} \times \text{с}^{-1}$ равна половине скорости инициирования $W_i = 18 \times 10^{-9} \text{ М} \times \text{с}^{-1}$. Это

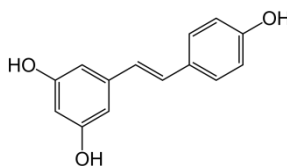


Рисунок 3.3 – Структурная формула ресвератрола

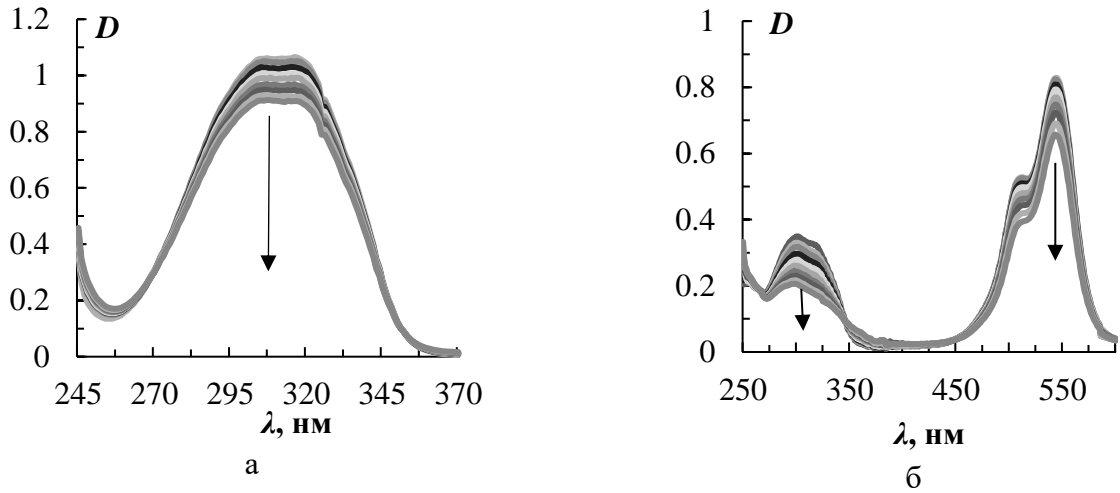


Рисунок 3.4 – Изменение спектров поглощения водных растворов во времени при 37 °С, содержащих 18×10^{-3} ААРН и а) $3,66 \times 10^{-5}$ М ресвератрола, б) $1,1 \times 10^{-5}$ М акцептора А и $1,1 \times 10^{-5}$ М RVT; спектры записаны через 1 мин

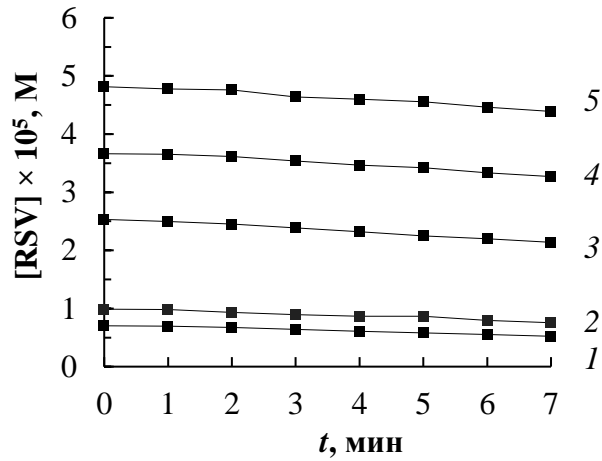


Рисунок 3.5 – Кинетические кривые расходования RVT в реакции с радикалами; [ААРН] = 18 мМ; [RVT] $\times 10^5$ М: 0,7 (1), 0,99 (2), 2,72 (3), 3,66 (4) и 4,82 (5)

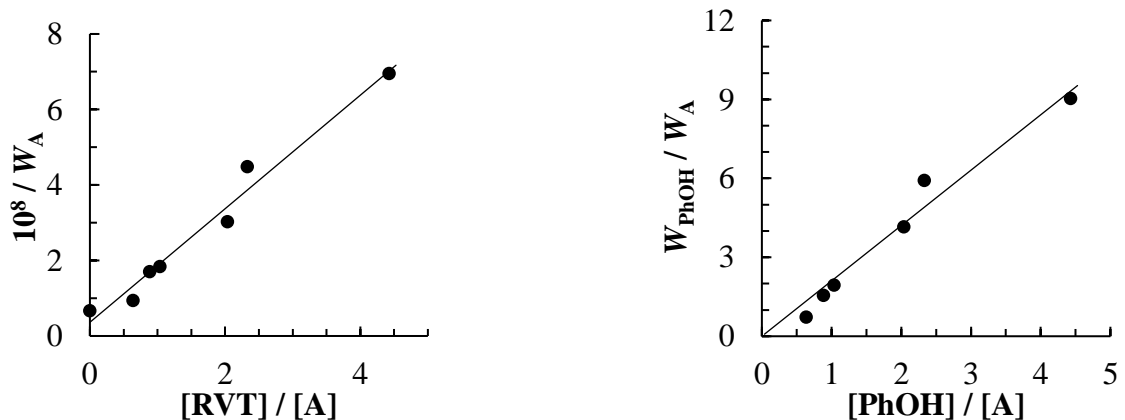


Рисунок 3.6 – а) Зависимость скорости расходования акцептора А (W_A) от соотношения концентраций $[RVT] / [A]$ в координатах уравнения (3.3); б) Зависимость соотношения скоростей расходования ресвератрола и акцептора (W_{PhOH} / W_A) от соотношения их концентраций $[RVT] / [A]$ в координатах уравнения (3.8)

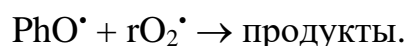
означает, что для ресвератрола в условиях данных экспериментов имеет стехиометрический коэффициент $f = 2$.

При близких концентрациях ресвератрола и красителя **A** в присутствии ААРН наблюдается расходование обоих компонентов (Рисунок 3.4). При постоянной скорости инициирования радикалов скорость расходования красителя уменьшается при добавках RVT, т.е. последний действует как конкурирующий акцептор радикалов так же, как и в случае тиолов.

Таблица 3.2 – Скорости расходования **A** и ресвератрола в реакции с радикалами, образующимися при распаде 18 мМ ААРН при 37 °С

| $[\text{PhOH}] \times 10^5,$ М | $W_{\text{PhOH}} \times 10^8,$ М \times с ⁻¹ | $[\text{A}] \times 10^5,$ М | $W_{\text{A}} \times 10^8,$ М \times с ⁻¹ | $[\text{PhOH}] / [\text{A}]$ |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|---|------------------------------|
| 0 | 0 | 1,07 | 1,5 | - |
| 0,6 | 0,77 | 0,94 | 1,06 | 0,64 |
| 0,65 | 1,06 | 0,63 | 0,54 | 1,04 |
| 0,9 | 1,37 | 0,44 | 0,33 | 2,04 |
| 0,91 | 0,91 | 1,03 | 0,59 | 0,89 |
| 1,15 | 1,3 | 0,3 | 0,14 | 4,43 |
| 1,9 | 1,32 | 0,82 | 0,22 | 2,33 |
| 2,34 | 1,44 | 0,34 | 0,08 | 6,52 |

При значениях скорости инициирования радикалов $W_i \leq 3 \times 10^{-8}$ М \times с⁻¹ и концентрациях $[\text{A}], [\text{PhOH}] > 5 \times 10^{-6}$ М перехватываются все радикалы. В отличие от акцептора **A** и тиолов ресвератрол подобно многим фенолам [34] в реакциях с пероксильным радикалами демонстрирует стехиометрический коэффициент $f = 2$. Поэтому кинетическую Схему 3.1, рассмотренную выше применительно к сочетаниям **A** с тиолами, следует дополнить реакцией феноксильного с пероксильным радикалом:



Однако феноксильный радикал может с достаточно высокой константой скорости реагировать с радикалом A^{\bullet} (k_{tAX} в Схеме 3.1), что приведет к уменьшению стехиометрического коэффициента ресвератрола до величины f^* . Если принять, что $W_i = f^* W_{\text{PhOH}} + W_A$, концентрация пероксильных радикалов равна:

$$[\text{rO}_2^{\bullet}] = W_i / k_A [\text{A}] + k_{\text{эф}} [\text{PhOH}], \quad (3.5)$$

где $k_{\text{эф}} = f^* k_{\text{PhOH}}$. При этом скорость расходования красителя при добавке PhOH выражается уравнением:

$$W_A = k_A [\text{A}] [\text{rO}_2^{\bullet}] = (k_A [\text{A}] W_i) / \{k_A [\text{A}] + k_{\text{эф}} [\text{PhOH}]\}. \quad (3.6)$$

Или в удобном для анализа экспериментальных данных виде:

$$1 / W_A = (1 + (k_{\text{эф}} / k_A) ([\text{PhOH}] / [\text{A}])) / W_i. \quad (3.7)$$

В Таблице 3.2 представлены экспериментально измеренные значения скоростей расходования красителя A и RVT при различных соотношениях концентраций PhOH и A . Из Рисунка 3.6а видно, что зависимость скорости расходования красителя A от концентраций обоих реагентов линеаризуется в координатах уравнения (3.7). На оси ординат отсекается отрезок, равный $1 / W_i$, а из наклона прямой $\text{tg } \varphi = k_{\text{эф}} (k_A \times W_i)$ можно вычислить значение $k_{\text{эф}} = 11,7 \times 10^4 (\text{M} \times \text{c})^{-1}$.

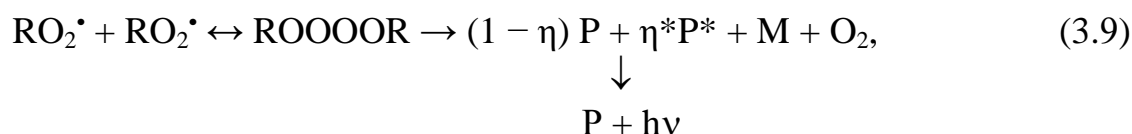
Поскольку спектры поглощения ресвератрола и красителя практически не перекрываются (Рисунок 3.4б), одновременно с измерением скорости расходования красителя были измерены скорости расходования ресвератрола. Из анализа Схемы 3.1 следует, что отношение скоростей пропорционально отношению их концентраций:

$$W_{\text{PhOH}} / W_A = (k_{\text{PhOH}} [\text{PhOH}]) / (k_A [\text{A}]). \quad (3.8)$$

Из Рисунка 3.6б видно, что экспериментальные данные в координатах уравнения (3.8) представляют собой прямую с наклоном $\text{tg } \varphi = k_{\text{PhOH}} / k_A = 1,96$. Вычисленное значение $k_{\text{PhOH}} = \text{tg } \varphi \times k_A = 10,6 \times 10^4 (\text{M} \times \text{c})^{-1}$ пределах 10%-ной ошибки совпадает с $k_{\text{эф}}$. Из этого следует, что пероксильные радикалы расходуются главным образом в параллельных реакциях с красителем и ресвератролом. Примечательно, что константа скорости реакции ресвератрола с пероксильными радикалами в водном растворе, равная $(1,1 \pm 0,1) \times 10^5 (\text{M} \times \text{c})^{-1}$, близка к

значениям, полученным в окисляющемся стироле ($k_{inh} = 1,4 \times 10^5 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$, $f = 1,9$ при $30 \text{ }^\circ\text{C}$ [270] и характеризует RVT как ингибитор средней силы.

Ресвератрол растворяется в органических растворителях, что позволило измерить кинетические характеристики его антирадикальной активности хемилюминесцентным (ХЛ) методом исследования [58; 59] по тушению хемилюминесценции, возникающей в экзотермической реакции рекомбинации пероксильных радикалов при окислении этилбензола, инициированном АИБН [58; 59]:



где М – молекула спирта, Р – кетон. В этой реакции обычно выделяется энергия 420–500 кДж / моль, достаточная для возбуждения триплетного уровня молекулы карбонильного соединения Р* с испусканием кванта света ХЛ в видимой области.

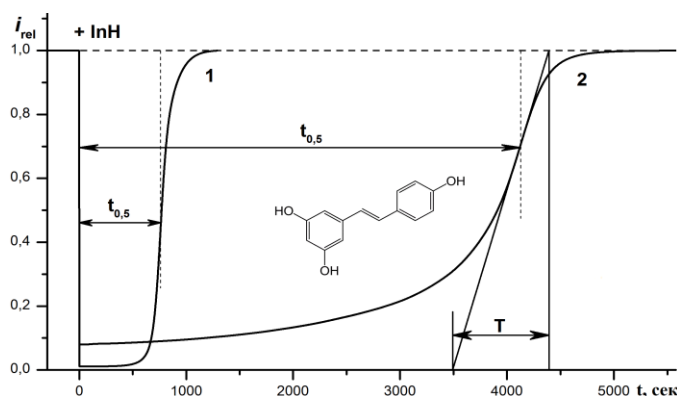


Рисунок 3.7 – Тушение хемилюминесценции при окислении этилбензола добавками ингибиторов: 1 – реперного ингибитора хромана, $4 \text{ } \mu\text{M}$; 2 – ресвератрола, $18,5 \text{ } \mu\text{M}$; $W_i = 9,2 \times 10^{-9} \text{ (M} \times \text{c}^{-1})$; $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$

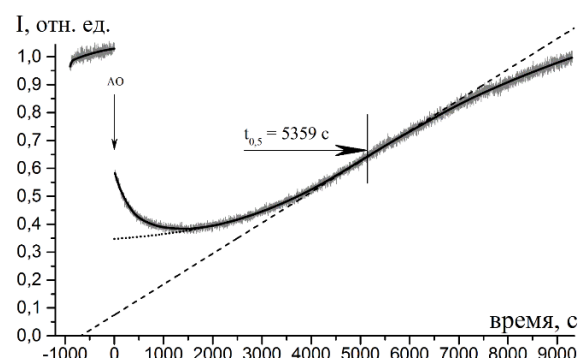


Рисунок 3.8 – Тушение ХЛ при окислении этилбензола добавкой $165 \text{ } \mu\text{M}$ *N*-ацетилцистеина; $W_i = 9,2 \times 10^{-9} \text{ (M} \times \text{c}^{-1})$; $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$

На Рисунке 3.7 представлены кинетические кривые тушения хемилюминесценции при окислении этилбензола при добавлении хромана, C_1 (кривая 1), синтетического аналога α -токоферола с высокой антирадикальной активностью, который часто применяется в качестве реперного ингибитора, у которого $f = 2$ и высокая $k_{inh} = 4,5 \times 10^6 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$, и RVT (кривая 2). Скорость иницирования W_i , заданная нужной концентрацией инициатора АИБН, уточняется

непосредственно в реакционной смеси до и после эксперимента по величине периода индукции в тушении ХЛ хроманом C_1 по формуле:

$$W_i = f [\text{InH}]_0 / t_{0,5} = 2[C_1]_0 / t_{0,5}, \quad (3.10)$$

где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, $[\text{InH}]_0$ – начальная концентрация ингибитора, $t_{0,5}$ – период торможения в секундах от момента введения образца до выхода интенсивности свечения по мере расходования ингибитора на уровень $I_{0,5}$ (Рисунок 3.7). При известных W_i , $[\text{InH}]_0$ и измеренных периодах торможения $t_{0,5}$, используя зависимость (3.10) можно оценить величину стехиометрического коэффициента f .

Величину k_{inh} , согласно теории, рассчитывают по тангенсу угла наклона касательной ($tg \varphi$) к кинетической кривой ХЛ на подъеме свечения в точке перегиба (Рисунок 3.7 и 3.8), когда обрыв цепей на ингибиторе сменяется квадратичной гибелью радикалов, по формуле [58; 59]:

$$k_{\text{inh}} = \frac{\sqrt{2k_t} \times tg \varphi}{\sqrt{W_i} \times 0,273}, \quad (3.11)$$

где $2k_t = 3,6 \times 10^7 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$ [30; 31; 59] – константа скорости квадратичной гибели пероксильных радикалов этилбензола. Рассчитанные из кинетических кривых тушения ХЛ значения параметров антирадикальной активности ресвератрола k_{inh} и f составляют:

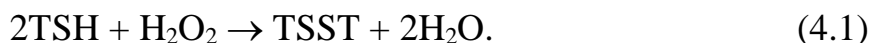
$$k_{\text{inh}} = (2,3 \pm 0,4) \times 10^5 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}; f = (2,1 \pm 0,2).$$

Тиолы практически не растворяются в органических растворителях, и все попытки использовать ХЛ метод для получения кинетических характеристик их антирадикальной активности не увенчались успехом. Наиболее удачный из всех экспериментов представлен на Рисунке 3.8, когда на ~40% удалось потушить интенсивность ХЛ значительной добавкой ASH. Из анализа этой кривой получается $f = 0,3$, $k_{\text{inh}} = 2,8 \times 10^4 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$. Вероятно, при повышенной температуре ASH реагирует с кислородом и образующимися гидропероксидами, что снижает величину f . Кроме того, гидрофильный ASH не растворяется в неполярных углеводородах, а в «хемилюминесцентном коктейле» может

образовывать кластеры, имитирующие растворение, но затрудняющие реакции с пероксильными радикалами.

Глава 4. Кинетика и механизм взаимодействия глутатиона и других природных тиолов с пероксидом водорода

В живых организмах восстановление гидропероксидов и регенерация глутатиона происходят ферментативным путем с участием, соответственно, глутатионпероксидаз и глутатионредуктаз. Однако с пероксидом водорода тиолы (TSH) реагируют непосредственно. В литературе редокс пара GSH / GSSG и H_2O_2 занимают центральное место в определении окислительно-восстановительного гомеостаза и редокс-сигнализации [18; 19; 197; 226;]. Известно и подтверждено многими авторами, что неферментативная реакция восстановления H_2O_2 происходит в соответствии со стехиометрическим уравнением:



Наряду с этим отмечается, что, несмотря на относительно простую стехиометрию, реакция протекает по сложному механизму, и скорость реакции зависит от соотношения концентраций GSH и H_2O_2 . Кроме того, у разных авторов сильно расходятся количественные характеристики скорости процесса и реакционной способности глутатиона и других эндогенных тиолов в реакции с H_2O_2 . Считается, что окислительно-восстановительные реакции с участием тиолов протекают гетеролитически с переносом электронов. Однако недавно было обнаружено, что при взаимодействии тиолов с хиноидными соединениями наряду с известным нуклеофильным замещением в ароматическом кольце имеет место радикально-цепная тиол-ен реакция, в которой расходуются оба компонента [7; 271; 272]. Образование радикалов в реакции тиола с гидропероксидами, приводящее к ускорению процесса, было установлено при окислении ряда углеводов и липидов с добавками меркаптоэтанола [273]. Поэтому особое внимание обращено на определение выхода радикалов в реакции тиолов с H_2O_2 , и реакцию проводили в среде тщательно очищенной деионизированной воды или бидистилляте, чтобы исключить влияние переходных металлов на распад H_2O_2 .

4.1. Кинетические закономерности реакции глутатиона с пероксидом водорода

Скорость образования радикалов определяли методом ингибиторов. В

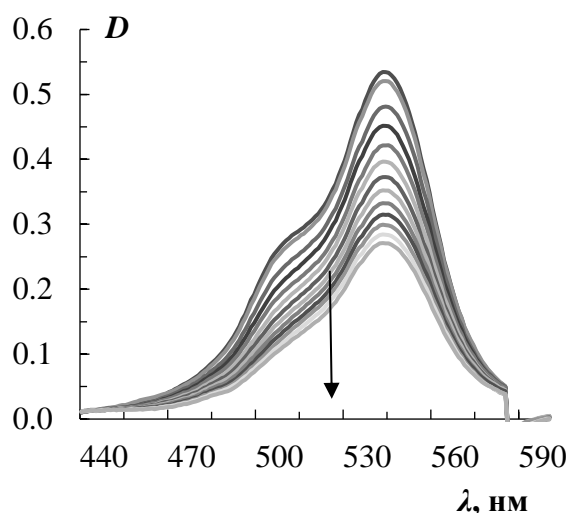


Рисунок 4.1 – Изменение спектров поглощения $7 \mu\text{M}$ А при взаимодействии со смесью 5 mM GSH и $5,3 \text{ mM}$ H_2O_2 ; водная среда, $37 \text{ }^\circ\text{C}$; интервал 1 мин

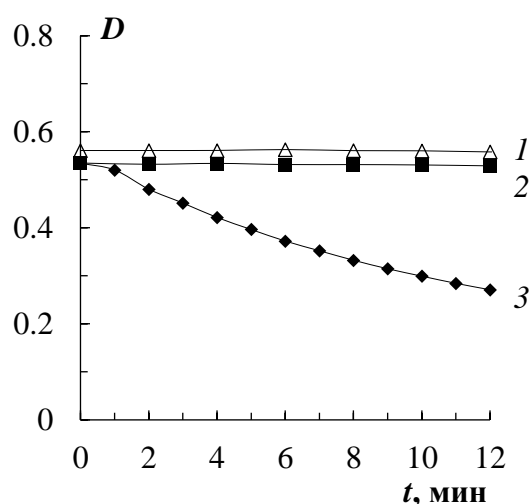


Рисунок 4.2 – Расходование $7 \mu\text{M}$ А в присутствии: 1 – 5 mM GSH; 2 – 5 mM H_2O_2 ; 3 – 5 mM GSH + 5 mM H_2O_2

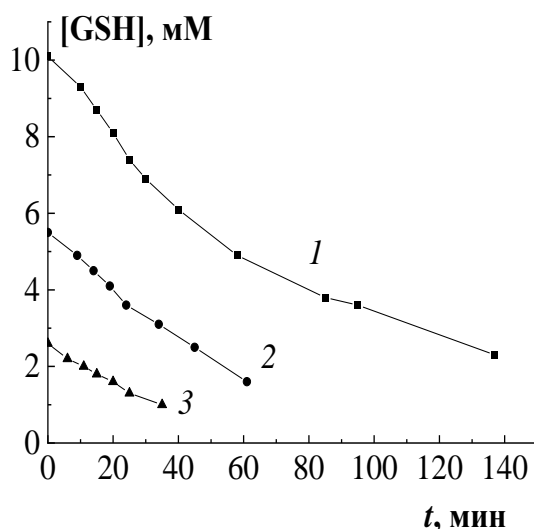


Рисунок 4.3 – Кинетические кривые расходования глутатиона при взаимодействии с $8,6 \text{ mM}$ H_2O_2 в водном растворе при $37 \text{ }^\circ\text{C}$; начальные концентрации GSH в mM: 1 – 2,6; 2 – 5,4; 3 – 10,1.

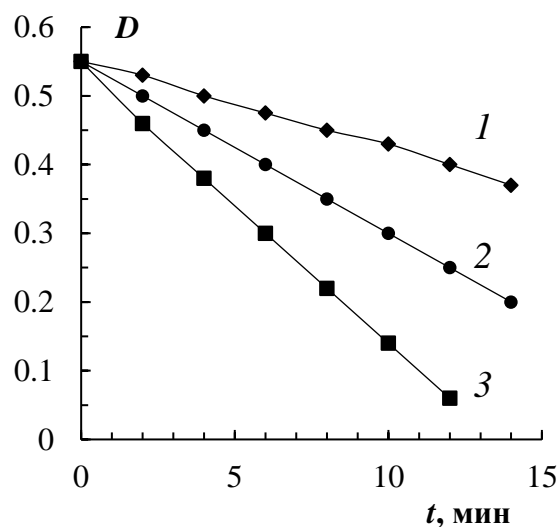


Рисунок 4.4 – Кинетические кривые расходования $7 \mu\text{M}$ красителя А при взаимодействии GSH с $8,6 \text{ mM}$ H_2O_2 в водном растворе при $37 \text{ }^\circ\text{C}$; начальные концентрации GSH в mM: 1 – 2,6; 2 – 5,4; 3 – 10,1

Таблица 4.1 – Скорости расходования акцептора А (7,2 μM) при разных концентрациях H_2O_2 в присутствии 5 мМ GSH, а также различных концентрациях GSH в присутствии 8,6 мМ H_2O_2 (водная среда, 37 $^\circ\text{C}$)

| [GSH] = 5 мМ; [A] = 7,2 μM | | | [H_2O_2] = 8,6 мМ; [A] = 7,2 μM | | |
|---------------------------------------|--|------------------|--|--|------------------|
| [H_2O_2], мМ | $W_A \times 10^9, \text{M} \times \text{c}^{-1}$ | | [GSH], мМ | $W_A \times 10^9, \text{M} \times \text{c}^{-1}$ | |
| | Эксперимент | Расчетные данные | | Эксперимент | Расчетные данные |
| 0,45 | $1 \pm 0,1$ | 0,88 | 1,0 | $1,3 \pm 0,15$ | 2,4 |
| 0,9 | $1,7 \pm 0,2$ | 1,62 | 2,5 | $3,8 \pm 0,4$ | 3,5 |
| 1 | $2,0 \pm 0,2$ | 1,8 | 5,0 | $6,2 \pm 0,6$ | 5,5 |
| 1,75 | $2,5 \pm 0,25$ | 2,52 | 6,9 | $7,3 \pm 0,7$ | 7,8 |
| 2 | $2,8 \pm 0,3$ | 2,8 | 8,0 | $9,85 \pm 1,0$ | 9,6 |
| 3,5 | $4,5 \pm 0,45$ | 4,25 | 10,0 | $10,0 \pm 1,0$ | 10,3 |
| 4,4 | $4,9 \pm 0,5$ | 4,95 | – | – | – |
| 8,8 | $5,6 \pm 0,6$ | 5,25 | – | – | – |

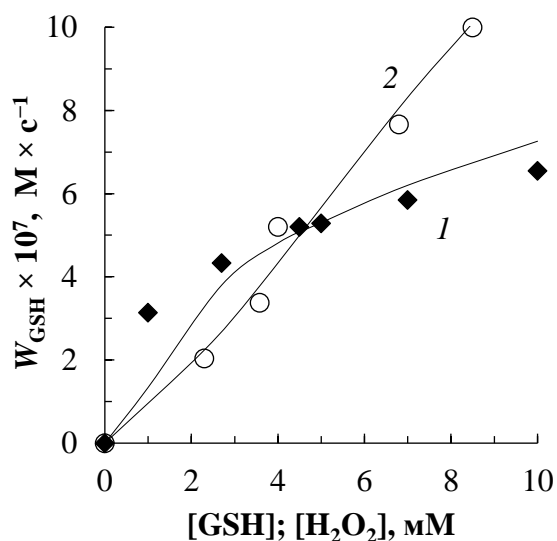


Рисунок 4.5а – Зависимость скорости расходования GSH (W_{GSH}): 1 (■) – от концентрации GSH в присутствии 4 мМ H_2O_2 ; 2 (○) – от концентрации H_2O_2 в присутствии 5 мМ GSH; водная среда, 37 $^\circ\text{C}$

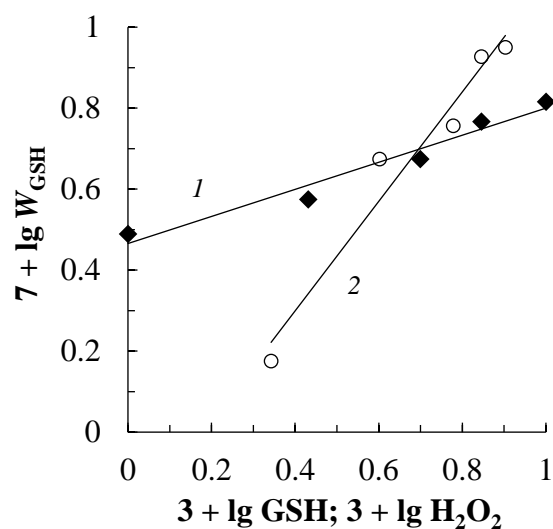


Рисунок 4.5б – Зависимость скорости расходования GSH от концентраций GSH (■) и H_2O_2 (○) в логарифмических координатах; условия как на Рисунке 4.5а

качестве акцептора свободных радикалов использовали полиметиновый краситель А (Рисунок 4.1). На Рисунке 4.2 показано, что акцептор А инертен по отношению

к тиолу и H_2O_2 , и его расходование наблюдается только при их совместном присутствии. Скорости расходования глутатиона и акцептора радикалов увеличиваются с ростом концентраций реагентов GSH и H_2O_2 (Рисунки 4.3, 4.4, 4.5, Таблица 4.1) [274].

На Рисунке 4.3 представлены кинетические кривые расходования GSH в реакции с H_2O_2 в водном растворе, а на Рисунке 4.4 – расходование акцептора радикалов А, добавленного в реакционные смеси аналогичного состава. Начальные скорости расходования GSH (W_{GSH}) и скорости расходования А, которые характеризуют скорость инициирования радикалов ($-\text{d}[\text{A}] / \text{d}t = W_i$), нелинейно зависят от концентраций реагентов (Рисунок 4.5 и Таблица 4.1 при разных соотношениях их концентраций $0,1 < [\text{GSH}]_0 / [\text{H}_2\text{O}_2]_0 < 2,5$). Линейные анаморфозы этих зависимостей в логарифмических координатах (например, Рисунок 4.5б) свидетельствуют о дробных порядках скорости расходования GSH по концентрациям реагентов. Эмпирические брутто-зависимости скорости расходования GSH и W_i от концентраций реагентов имеют вид:

$$W_{\text{GSH}} \cong \text{const} [\text{GSH}]_0^{0,3} [\text{H}_2\text{O}_2]_0^{1,2}, \quad (4.2)$$

где $\text{const} = (1,7 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ M}^{-0,5} \times \text{c}^{-1}$,

$$W_i \cong \text{const} [\text{GSH}]_0^{0,75} [\text{H}_2\text{O}_2]_0^{0,75}, \quad (4.3)$$

где $\text{const} = (1,3 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ M}^{-0,5} \times \text{c}^{-1}$.

Таблица 4.2 – Скорости расходования глутатиона, образования радикалов и выход радикалов в реакции GSH с 8,6 мМ H_2O_2 (водный раствор, 37 °С)

| [GSH], мМ | $W_{\text{GSH}} \times 10^6$, $\text{M} \times \text{c}^{-1}$ | $W_i \times 10^8$, $\text{M} \times \text{c}^{-1}$ | e |
|-----------|---|--|--------|
| 10,1 | 1,9 | 0,7 | 0,0035 |
| 5,4 | 1,3 | 0,54 | 0,004 |
| 2,6 | 0,86 | 0,29 | 0,003 |

В Таблице 4.2 сопоставлены скорости расходования GSH и А, измеренные в одинаковых условиях. Это сравнение показывает, что выход радикалов в реакции GSH с H_2O_2 , $e = W_i / |\text{d}[\text{GSH}] / \text{d}t|$, небольшой, доли процента, что на порядок ниже

выхода радикалов в реакции меркаптоэтанола с гидропероксидом третбутила [273] ($e \sim 0,02$).

На Рисунке 4.6 сопоставлены скорости расщедования акцептора А, т.е. W_i / ε , в реакции трех эндогенных тиолов глутатиона, гомоцистеина и цистеина с H_2O_2 при разных концентрациях пероксида. Видно, что реакционная способность тиолов в генерировании радикалов при взаимодействии с H_2O_2 изменяется в ряду [261]:

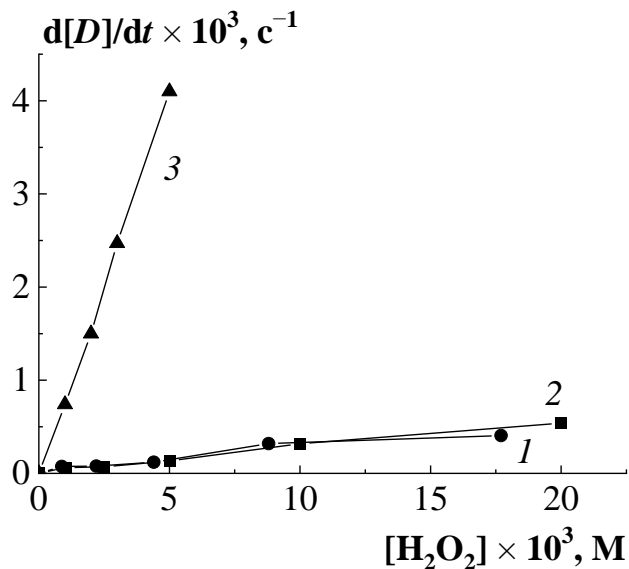


Рисунок 4.6 – Зависимость скорости расщедования $10 \mu\text{M}$ А от концентрации H_2O_2 в присутствии 5 mM тиолов: 1 – GSH; 2 – HSH; 3 – CSH; водная среда, 37°C

Дробные порядки по концентрациям основных реагентов, как правило, свидетельствуют о сложном многостадийном механизме процесса, который включает стадию образования радикалов и реакции, в которых происходит основное расщедование GSH и H_2O_2 . Примечательно, что измеренная в [166] методом время-разрешенной рамановской спектроскопии скорость расщедования GSH в водном растворе при концентрациях реагентов 1 M , равная $2 \times 10^{-3} \text{ M} \times \text{c}^{-1}$, практически совпадает с величиной скорости $W_{\text{GSH}} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ M} \times \text{c}^{-1}$, рассчитанной по уравнению (4.2).

Все представленные выше данные получены с использованием в качестве реакционной среды бидистиллированной и деионизированной воды, тогда как большинство биохимических исследований проводят в фосфатных буферных растворах, поскольку биологические жидкости (кровь, лимфа...) имеют рН 7,2–7,4 и представляют собой буферные системы.

На Рисунке 4.7а сопоставлено расхождение GSH в реакции с H_2O_2 в воде и двух фосфатных буферных растворах PBS (исходный рН 7,4) и PB (исходный рН 7,2, см. Таблица 5.3), а на Рисунке 4.7б представлено сравнение расхождения акцептора А в аналогичных условиях [275]. Видно, что в фосфатных буферных растворах увеличивается скорость расхождения GSH (W_{GSH}) и резко снижается скорость образования радикалов.

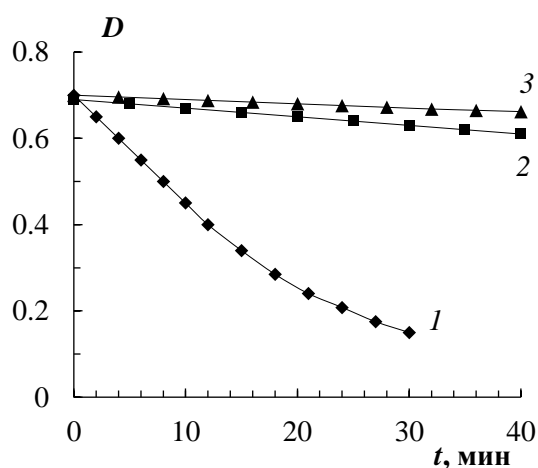
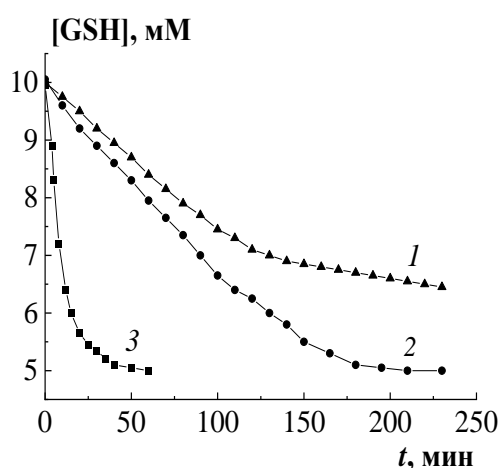


Рисунок 4.7а – Кинетические кривые расхождения 10 мМ глутатиона в реакции с 2 мМ H_2O_2 в воде (1), PBS (2) и фосфатном буфере PB (3)

Рисунок 4.7б – Кинетические кривые расхождения 9 мМ акцептора А в реакции 10 мМ GSH с 2 мМ H_2O_2 в воде (1), PBS (2) и фосфатном буфере PB (3)

Одной из причин увеличения W_{GSH} в PBS и, особенно, в PB является окисления GSH кислородом воздуха. В буферных растворах израсходовалось больше GSH (5 мМ), чем требуется согласно стехиометрии уравнения (4.1), тогда как в воде израсходовалось ≤ 4 мМ. Обращает на себя внимание существенное влияние NaCl и KCl в составе PBS (Таблица 5.3), в отличие от натрий-калиевой фосфатной буферной смеси PB – на скорость расхождения GSH и W_i : при прочих равных условиях W_{GSH} в PBS в 7 раз меньше, чем в PB, не содержащем хлоридов, а

W_i в 3 раза выше. Эти данные частично объясняют, почему в огромном количестве публикаций по глутатиону практически никто не упоминает про образование радикалов в реакции GSH с H_2O_2 . Вопрос о большой разнице во влиянии близких по ионной силе PBS и PB на кинетику реакции GSH с H_2O_2 будет рассмотрен в Главе 5.

4.2. Определение природы радикалов, образующихся в реакции глутатиона с пероксидом водорода

Для исследования природы радикалов, образующихся при взаимодействии GSH с H_2O_2 был применен метод спиновых ловушек с использованием 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида (DMPO).

Спиновые ловушки широко используются в химии и биологии для идентификации короткоживущих радикалов [276; 277]. Реакция спиновой ловушки DMPO с короткоживущим радикалом R^\cdot приводит к образованию спинового аддукта – стабильного нитроксильного радикала (Рисунок 4.8).

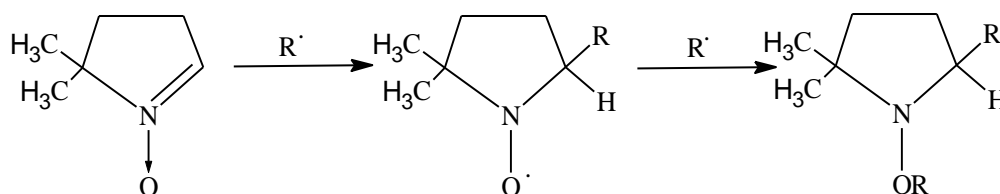


Рисунок 4.8 – Структура спин-ловушки DMPO и химические реакции, в которых участвует спин-ловушка и ее аддукты

Природа присоединенного короткоживущего радикала определяется по магнитно-резонансным параметрам образующегося нитроксильного радикала [276]. Чтобы обеспечить преимущественное образование нитроксильного радикала используют высокие концентрации DMPO. В работах [20; 21; 214] с помощью этой ловушки были получены спектры ЭПР аддуктов DMPO с тиольными радикалами глутатиона (GS^\cdot), которые генерировали путем фотолиза соответствующих дисульфидов [278] или в цепи радикальных или ферментативных реакций [20; 21].

Предварительно был проведен анализ взаимодействия нитроксильного радикала TEMPO с глутатионом и H_2O_2 вместе и по отдельности, что позволило

определить оптимальные условия для применения метода спиновых ловушек и обнаружения нитроксильных радикалов (спин-аддуктов) в присутствии тиолов (Рисунок 4.8). Глутатион является сильным восстановителем, и благодаря наличию в молекуле двух карбоксильных групп, при растворении в воде образует кислые растворы ($\text{pH} \sim 3\text{--}4$ при миллимолярных концентрациях GSH). Оба обстоятельства способствуют быстрому восстановлению и/или дисмутации нитроксильных радикалов.

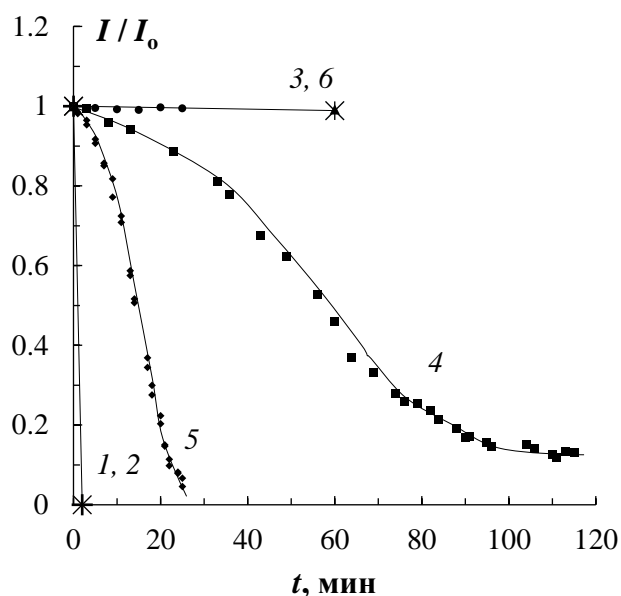


Рисунок 4.9 – Кинетические кривые расходования TEMPO в бидистилляте (1–3, 6) и в PBS (4, 5): 1 – 4 мМ GSH и 0,3 мМ TEMPO; 2 – 4 мМ GSH, 2,1 мМ H_2O_2 и 0,3 мМ TEMPO; 3 – 2 мМ H_2O_2 , 0,3 мМ TEMPO; 4 – 3,15 мМ GSH и 0,07 мМ TEMPO; 5 – 3,15 мМ GSH, 2,3 мМ H_2O_2 и 0,07 мМ TEMPO; 6 – 0,3 мМ TEMPO в воде с добавкой HCl (pH 3,2; 6,05)

Из Рисунка 4.9 видно, что при добавлении TEMPO в водный раствор GSH или в смесь GSH и H_2O_2 нитроксил быстро расходуется и уже через 2 мин не обнаруживается в спектрах ЭПР (кривые 1, 2). Раствор GSH с концентрацией 3,15 мМ в бидистилляте имеет значение pH , равное 3,2. Известно, что в кислой среде ускоряется дисмутация и другие реакции нитроксильных радикалов. При исследовании поведения TEMPO в кислой среде, полученной в результате добавки в воду HCl при pH 3,2 и 6,05 (кривая 6), и в присутствии только H_2O_2 (кривая 3) установлено, что в отсутствие глутатиона TEMPO не расходуется. Быстрое

расходование TEMPO в смеси с GSH в водном растворе указывает, что GSH подобно аскорбиновой кислоте [279–281] восстанавливает нитроксильные радикалы в соответствующий гидроксилламин. Если к фосфатно-солевому буферному раствору PBS с исходным pH 7,4 добавить GSH в концентрации 3,15 мМ, то величина pH снижается до 6,08. В этих условиях время полупревращения TEMPO составляет ~ 1 ч (кривая 4). В смеси GSH и H₂O₂ в буферном растворе PBS (кривая 5) время полупревращения TEMPO уменьшается до 20 мин.

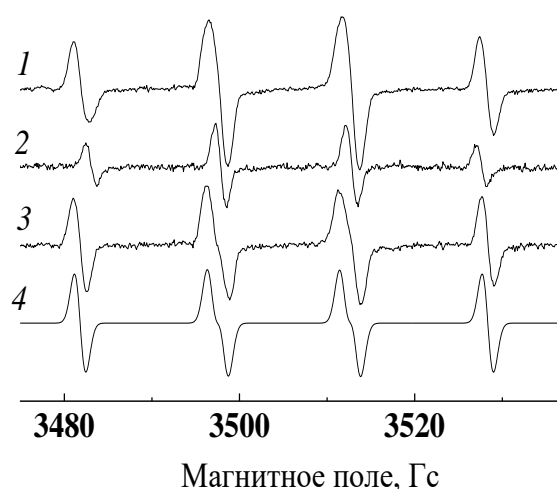


Рисунок 4.10 – ЭПР спектры спиновых аддуктов DMPO, полученных в смеси GSH с H₂O₂: (1) сумма аддуктов; (2) с радикалом HO•; (3) с GS•; (4) модельный спектр с константами СТВ GS•

Проведенные исследования расходования нитроксильного радикала показали, что регистрацию спиновых аддуктов DMPO с радикалами, которые образуются при взаимодействии GSH и H₂O₂, следует проводить в буферных растворах при pH около 7.

На Рисунке 4.10 представлен ЭПР спектр (1) спинового аддукта DMPO, полученного в растворе, содержащем 21,13 мМ DMPO, 33 мМ GSH и 71 мМ H₂O₂; pH 6,2. ЭПР спектр спинового аддукта представляет собой суперпозицию сигналов двух разных нитроксильных радикалов. Один из них принадлежит спиновому аддукту с HO•-радикалом. Спектр этого нитроксильного радикала (2) с константами СТВ $a_N = 14,9$ Гс и $a_H = 15,0$ Гс был получен отдельно при УФ-облучении водного раствора, содержащего 10 мМ H₂O₂ и 13,3 мМ DMPO. Этот

спектр ЭПР был вычтен из суммарного ЭПР спектра (1). Результат вычитания – спектр 3, моделирование которого дало константы СТВ нитроксильного радикала: $a_N = 15,20$ Гс и $a_H = 16,35$ Гс, совпадающие со значениями констант СТВ спинового аддукта DMPO с тиильными радикалами глутатиона GS[•], полученными при фотолизе дисульфида GSSG [278; 282].

Тиильные радикалы, образующиеся при взаимодействии GSH с H₂O₂ зарегистрированы впервые. Полученные результаты позволяют однозначно утверждать, что в системе GSH – H₂O₂ при pH ≤ 7 образуются два типа радикалов: тиильные GS[•] и гидроксильные [•]OH [283].

4.3. Тиол-ен реакция глутатиона с ресвератролом в присутствии пероксида водорода. Кинетическая модель

Скорость образования радикалов (W_i), при взаимодействии глутатиона с H₂O₂ составляет доли процента (< 1%) от скорости расходования GSH (W_{GSH}), но ее может быть достаточно для инициирования тиол-ен реакций тиолов с ненасыщенными соединениями.

Тиильные радикалы активно присоединяются к двойным связям [207; 208]. Эти реакции лежат в основе реакций тиолов с ненасыщенными соединениями, которые получили название тиол-ен click-реакций [26; 216–221], которые применяют, в основном, для синтеза линейных и разветвленных гетероцепных полимеров. В работах [273; 284] обнаружено взаимодействие меркаптоэтанола и глутатиона с β-каротином, в молекуле которого содержится 11 сопряженных ненасыщенных связей, при этом скорость его расходования с добавкой глутатиона без добавок гидропероксида относительно невелика. Все перечисленные выше исследования проведены в среде липидов и других органических растворителей.

В работе исследовано взаимодействие гидрофильных тиолов, в основном,

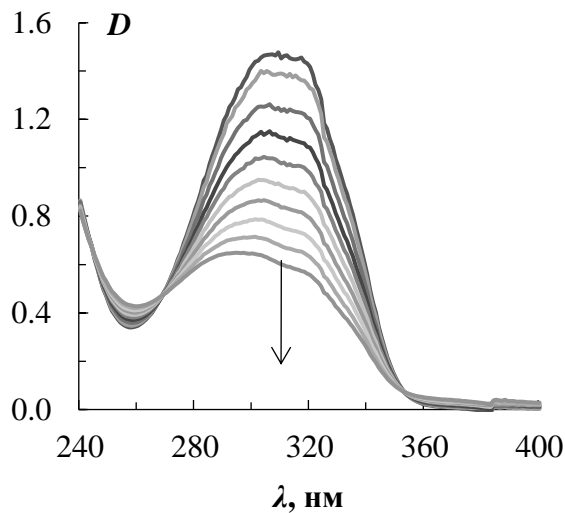


Рисунок 4.11 – Изменение УФ спектров поглощения 0,05 мМ ресвератрола в смеси с 5 мМ глутатиона и 8,6 мМ H_2O_2 ; 37 °С. Интервалы между записями спектров – 1 мин

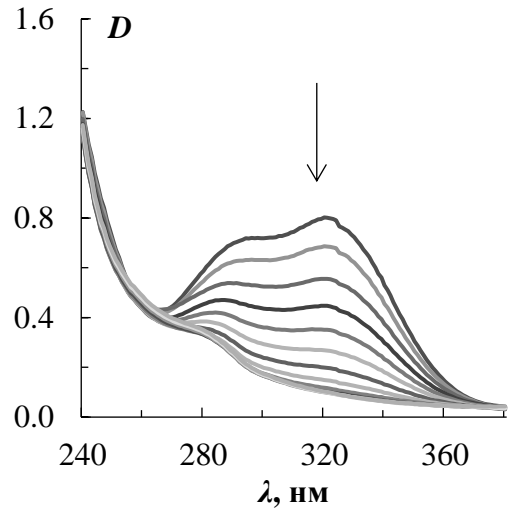


Рисунок 4.12 – Изменение УФ спектров поглощения 0,05 мМ кофейной кислоты в смеси с 5 мМ глутатиона и 8,6 мМ H_2O_2 ; 37 °С. Интервалы между записями спектров – 2 мин

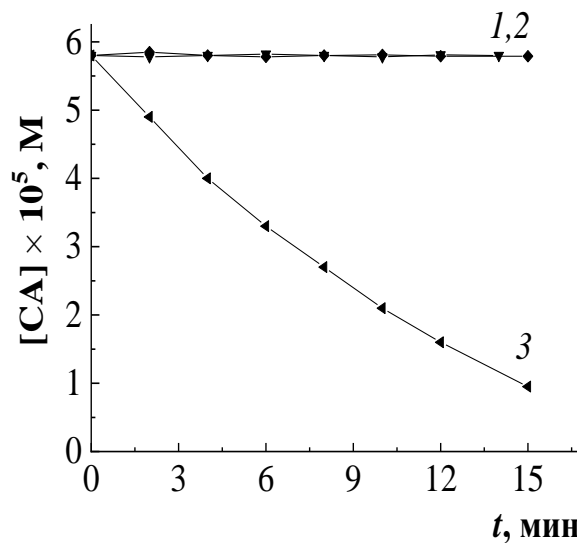


Рисунок 4.13 – Кинетические кривые расходования 5,8 мМ СА в присутствии 5 мМ GSH (1) и H_2O_2 8,6 мМ (2) по отдельности и вместе (3); 37 °С

главного эндогенного тиола глутатиона, с представителями большой группы природных фенолов с двойной связью в боковой цепи, а именно с ресвератролом (RVT) растительным фитоалексином, и с кофейной кислотой (CA) в водных растворах. Кофейная кислота подобно другим производным коричной кислоты является метаболитом биосинтеза лигнина. Эти фенолы имеют характерные УФ спектры поглощения, что позволяет регистрировать изменение их концентрации в

ходе реакции (Рисунки 4.11 и 4.12). На Рисунке 4.13 показано, что кофейная кислота подобно ресвератролу практически не расходуется в присутствии взятых по отдельности GSH и H_2O_2 . Только при совместном присутствии GSH и H_2O_2 эти фенольные антиоксиданты расходуются [285; 286].

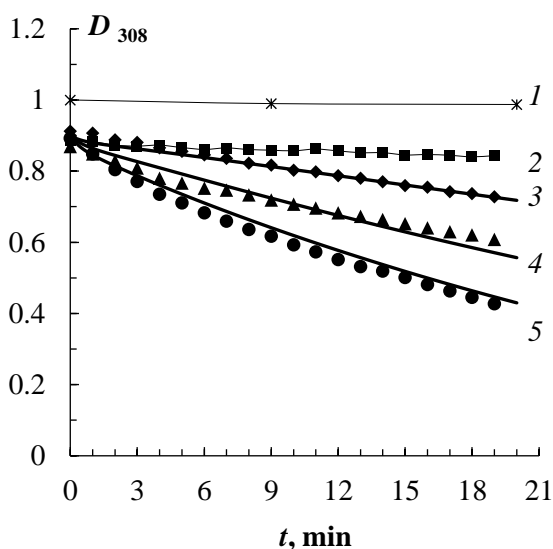


Рисунок 4.14 – Кинетические кривые расходования 0,03 мМ RVT в реакции с GSH в отсутствие (1) и присутствии 4,55 мМ H_2O_2 (2–5); концентрация GSH в мМ: 1 – 25 (концентрация RVT 0,033 мМ); 2 – 0; 3 – 2,5; 4 – 5,0; 5 – 10. Точки – экспериментальные данные, сплошные линии – расчетные данные по кинетической модели (Таблица 4.5)

На Рисунке 4.14 представлены кинетические кривые расходования RVT в присутствии большой концентрации GSH (25 мМ), но без H_2O_2 (кривая 1) и серия кривых в присутствии H_2O_2 , но при разных концентрациях GSH (кривые 2–5). Видно, что расходование RVT, который является эффективным акцептором радикалов, наблюдается только при совместном присутствии GSH и H_2O_2 (кривые 3–5). Необходимо отметить, что введение GSH в реакционную среду приводит к снижению pH (Таблица 4.4).

Скорости расходования RVT (W_{RVT}), как и W_{GSH} (Рисунок 4.5а), нелинейно зависят от концентраций GSH и H_2O_2 . В Таблице 4.4 представлены значения W_{RVT} , экспериментально измеренные при разных концентрациях GSH в присутствии 4,55 мМ H_2O_2 , и скорости инициирования радикалов (** W_i), рассчитанные по уравнению 4.3, которое получено эмпирически на основе измерения скоростей расходования акцептора А в смесях GSH и H_2O_2 разного состава.

Таблица 4.4 – Скорости расходования 0,03 мМ RVT и глутатиона при разных концентрациях GSH в присутствии 4,55 мМ H₂O₂, деионизированная вода, 37 °С

| [GSH], мМ | pH* | $W_{\text{GSH}} \times 10^7$, М × с ⁻¹ | $W_{\text{RVT}} \times 10^9$, М × с ⁻¹ | ** $W_i \times 10^9$, М × с ⁻¹ |
|-----------|------|---|---|---|
| 0 | 6,70 | 0 | 0 | 0 |
| 2,0 | 3,28 | 1,62 | 4,3 | 2,1 |
| 2,5 | 3,23 | 1,72 | 5,5 | 2,5 |
| 5,0 | 3,10 | 2,14 | 8,2 | 4,2 |
| 7,0 | 3,03 | 2,37 | 11,6 | 5,4 |
| 10,0 | 3,00 | 2,63 | 17,5 | 7,1 |

*рН измеряли в реакционном сосуде после добавления всех реагентов;

** W_i , рассчитано по формуле (4.3)

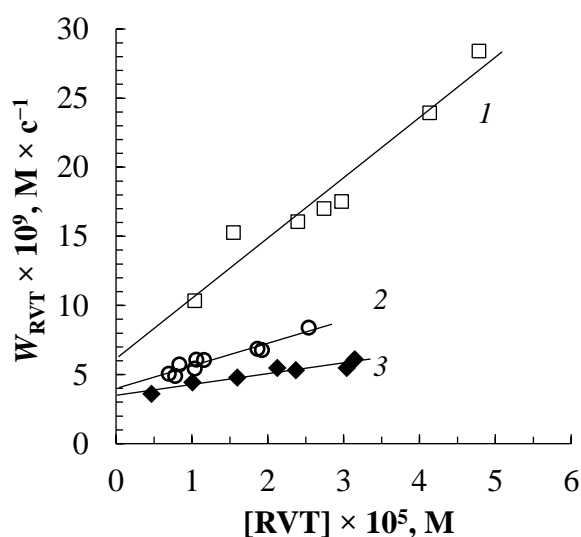


Рисунок 4.15 – Зависимости скоростей расходования RVT (W_{RVT}) от концентрации RVT в реакционной смеси 4,55 мМ H₂O₂ с разными начальными концентрациями GSH (мМ): 1 – 10; 2 – 5; 3 – 2,5

Скорости расходования RVT (W_{RVT}) линейно возрастают с ростом [RVT] (Рисунок 4.15). Примечательно, что отрезки, отсекаемые линейными зависимостями $W_{\text{RVT}} - [\text{RVT}]$ на оси ординат, практически (в пределах ошибки) совпадают с расчетными значениями $**W_i$ для соответствующих концентраций GSH. Скорость расходования RVT удовлетворительно описывается уравнением

(4.4) для скорости цепного процесса (окисления или полимеризации) с квадратичным обрывом цепей на ведущих цепи радикалах:

$$W_{RVT} = W_i + a [RVT] W_i^{0.5}. \quad (4.4)$$

Здесь параметр $a \cong 1,0 \text{ (M} \times \text{c)}^{-0,5}$ аналогичен отношению констант скорости реакций продолжения (k_p) и обрыва цепей (k_t) $a = k_p / (2k_t)^{0.5}$. Из Таблицы 4.4 можно видеть, что длина цепи в расходе ресвератрола (W_{RVT} / W_i), невелика, порядка 2-х звеньев, и выход радикалов в реакциях GSH с H_2O_2 меньше 1% ($W_i / W_{GSH} < 0,01$).

Исследование продуктов взаимодействия GSH с H_2O_2 и RVT проводили методом масс-спектрометрии (MS электроспрей положительных ионов) в Центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН. Анализ состава продуктов (Рисунок 4.16) показал следующее:

1. В исходном растворе GSH присутствуют достаточно устойчивые димеры GSH – GSH (ионы MH^+ 615,17). В работе [234] было отмечено, что при исследовании масс-спектров GSH методом электроспрея отрицательных ионов в водном растворе наряду с ионами GSH обнаруживаются ионы димера, тогда как в фосфатном буферном растворе (0,1 М, pH ~ 7) димер не регистрируется. Очевидно, одноименно отрицательно заряженные вследствие диссоциации карбоксильных групп ионы глутатиона не образуют димеров при $\text{pH} \geq 7$.

2. Основным продуктом окисления GSH в реакции с H_2O_2 в согласии с уравнением (4.1) является соответствующий дисульфид GSSG (MH^+ 613,16).

3. В смеси GSH, RVT и H_2O_2 в исходно деионизированной воде основные продукты – дисульфид GSSG и продукт MH^+ 568,16, масса которого соответствует гидропероксиду (PO_2H), который может получиться в результате последовательного присоединения тиольного радикала GS^\bullet и кислорода к RVT:



где P – продукт присоединения тиольного радикала GS^\bullet к двойной связи RVT в боковой цепи.

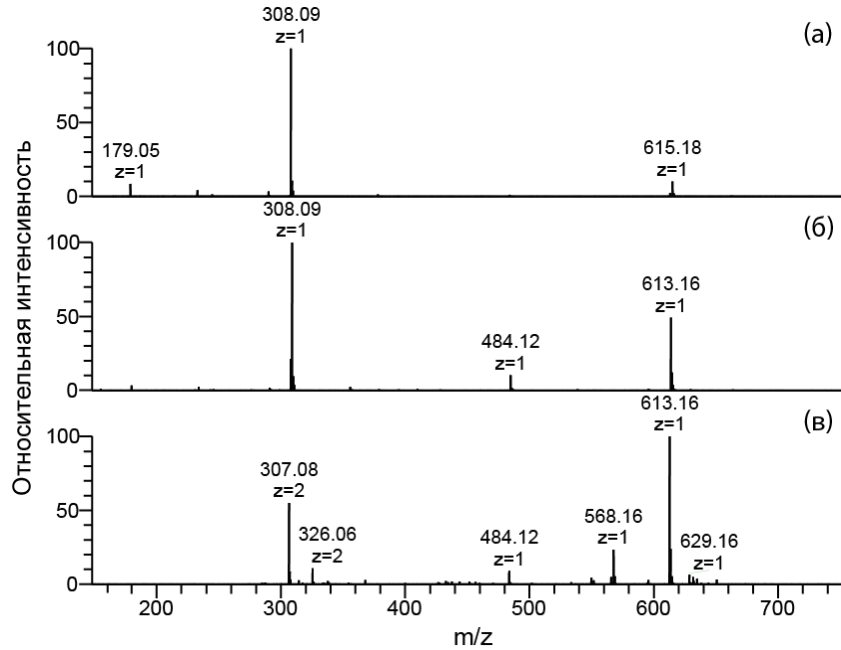


Рисунок 4.16 – Масс-спектры исходного глутатиона (а), продуктов реакции 10 мМ GSH с 2 мМ H₂O₂ (б) и продуктов, образующихся в смеси 2,3 мМ GSH, 1,3 мМ RVT и 3,2 мМ H₂O₂ (в) в деионизированной воде

Анализ кинетики взаимодействия GSH с RVT в присутствии H₂O₂ проводили методом компьютерного моделирования с использованием программ [287; 288]. Кинетическую модель (Таблица 4.5) для описания взаимодействия GSH с H₂O₂ (реакции (I)–(X)) и инициированной образующимися радикалами тиол-ен реакцию GSH с RVT (реакции (XI)–(XIX)) разрабатывали с учетом полученных экспериментальных и имеющихся в литературе данных. Реакции (I)–(III) образования комплекса [GSH – H₂O₂] и окисления его в дисульфид GSSG (хотя в масс-спектрах продуктов реакции на Рисунке 4.16б не обнаруживается соответствующий комплексу ион MH⁺ 342) введены в модель, поскольку в литературе [22; 166; 236] приводятся достаточно убедительные результаты спектроскопических (УФ и ИК) исследований и теоретического анализа [23] образования комплексов [GSH – H₂O₂] не только в буферных растворах с физиологическим pH, но и в чистой воде [166], когда образуется кислая реакционная смесь с pH 2. При конструировании модели было принято, что образование радикалов происходит, в основном, в реакции (VII) димера [GSH – GSH] с H₂O₂, поскольку было установлено, что при pH ≥ 7, когда димеры не

Таблица 4.5 – Кинетическая модель взаимодействия GSH с RVT в присутствии H₂O₂ в водной среде при 37 °С

| №№ | Реакции | Константы скорости | $k_i, (M \times c)^{-1}$ |
|-------|---|--------------------|--------------------------|
| I | $GSH + H_2O_2 \rightarrow [GSH - H_2O_2]$ | k_1 | 5 |
| II | $[GSH - H_2O_2] \rightarrow GSH + H_2O_2$ | k_2 | $*4 \times 10^{-3}$ |
| III | $[GSH - H_2O_2] + GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ | k_3 | 6×10^{-2} |
| IV | $GSH + GSH \rightarrow [GSH - GSH]$ | k_4 | 1,3 |
| V | $[GSH - GSH] \rightarrow GSH + GSH$ | k_5 | $*9 \times 10^{-4}$ |
| VI | $[GSH - GSH] + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ | k_6 | $1,5 \times 10^{-3}$ |
| VII | $[GSH - GSH] + H_2O_2 \rightarrow 2GS^* + 2H_2O$ | k_7 | 2×10^{-5} |
| VIII | $GSH + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + GS^* + H_2O$ | k_8 | 1×10^{-3} |
| IX | $\cdot OH + GSH \rightarrow H_2O + GS^*$ | k_9 | 1×10^6 |
| X | $GS^* + GS^* \rightarrow GSSG$ | k_{10} | 1×10^9 |
| XI | $GS^* + RVT \rightarrow P^*$ | k_{11} | $2,5 \times 10^5$ |
| XII | $P^* \rightarrow GS^* + RVT$ | k_{12} | $*1 \times 10^4$ |
| XIII | $P^* + GSH \rightarrow GS^* + PH$ | k_{13} | 5×10^4 |
| XIV | $P^* + (O_2) \rightarrow PO_2^*$ | k_{14} | $**1 \times 10^6$ |
| XV | $PO_2^* + GSH \rightarrow POOH + GS^*$ | k_{15} | 5×10^3 |
| XVI | $GS^* + PO_2^* \rightarrow GSH + O_2$ | k_{16} | 1×10^9 |
| XVII | $GSH + RVT \rightarrow [GSH - RVT]$ | k_{17} | 5 |
| XVIII | $[GSH - RVT] \rightarrow GSH + RVT$ | k_{18} | 2×10^{-4} |
| XIX | $[GSH - RVT] + GS^* \rightarrow P^* + GSH$ | k_{19} | 1×10^6 |

Примечание. P* – алкильный радикал, образующийся в результате присоединения тиольного радикала GS* к двойной связи RVT; PO₂* и POOH – соответствующие пероксильный радикал и гидропероксид.

* Константа скорости имеет размерность с⁻¹;

** $k_{14} = k [O_2]$, имеет размерность с⁻¹; $[O_2] = 1 \times 10^{-4}$ М.

образуются, резко уменьшается скорость образования радикалов. Реакции (VII) и (VIII), в которых генерируются радикалы, практически не влияют на скорость

расходования GSH (W_{GSH}). Тиоловая группа $-\text{SH}$ в комплексах с H_2O_2 [22; 236] и димерах определяется реактивом Элмана так же, как в свободном GSH. Величина $k_{10} = 10^9 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$ известна для быстрой рекомбинации тиольных радикалов. Нами константа квадратичной гибели тиольных радикалов была определена методом флеш-фотолиза дифенилдисульфида для рекомбинации фенилтиольных радикалов.

Реакции (XI)–(XVI) имеют место при добавках RVT и вместе с остальными реакциями описывают кинетические кривые расходования RVT. Известно, что тиольные радикалы с высокими константами скорости обратимо ($\sim 10^5 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$) присоединяются к двойным $-\text{C}=\text{C}-$ связям [208], поэтому в модель введены реакции (XI) и (XII) [289]. Образующийся в результате присоединения GS^* к RVT алкильный радикал R^* может прореагировать с GSH ($k_{13} \sim 10^5\text{--}10^6 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$) или с кислородом, поскольку эксперименты проводили в аэробных условиях ($k_{14} \sim 10^9\text{--}10^{10} \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$) [31]).

В Таблице 4.6 приведены рассчитанные по модели значения квазистационарных концентраций радикалов, из которых видно, что в присутствии O_2 доминируют пероксильные радикалы и увеличивается содержание молекулярных продуктов присоединения радикалов GS^* к RVT. Определяющая роль O_2 в кинетике присоединения тиольных радикалов к олефинам при изучении ее методом флеш-фотолиза отмечена и проанализирована в работах [290; 291].

На Рисунке 4.17 представлены экспериментально многократно повторенные и воспроизводимые кинетические кривые расходования глутатиона и ресвератрола, взятых при сопоставимых по масштабу концентрациях. Вопреки нашим ожиданиям, в присутствии RVT скорость расходования GSH не увеличивается за счет дополнительного расходования в цепной реакции с RVT, а уменьшается. Чтобы получить такой эффект, модель дополнили обратимым связыванием RVT с GSH в комплекс $[\text{RVT} - \text{GSH}]$ (реакции (XVII)–(XIX)).

Представленная кинетическая модель с оптимизированными константами скоростей вполне удовлетворительно описывает экспериментальные кинетические кривые расходования RVT и GSH в реакции GSH с RVT в присутствии H_2O_2 и

экспериментальные концентрационные зависимости для W_{RVT} и W_{GSH} . Дополнение модели обратимыми реакциями образования комплексов RVT с компонентами процесса (реакции (XVII)–(XIX)) позволило описать нетривиальный эффект заметного уменьшения скорости расходования GSH при повышенных концентрациях RVT.

Таблица 4.6 – Влияние кислорода на тиол-ен реакцию GSH с RVT в присутствии H_2O_2 (Рассчитанные по модели для Рисунка 4.17 значения концентраций компонентов при $t = 150$ мин)

| Условия | $[GS^*]$, М | $[P^*]$, М | $[PO_2^*]$, М | $[PH]$, М | $[POOH]$, М | ΔGSH , М |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Без RVT, Реакции (I)–(X) | $7,3 \times 10^{-10}$ | - | - | - | - | $3,4 \times 10^{-4}$ |
| + RVT без O_2 Реакции (I)–(XIII) | $7,3 \times 10^{-10}$ | $8,6 \times 10^{-12}$ | - | $1,9 \times 10^{-6}$ | - | $3,4 \times 10^{-4}$ |
| + RVT и O_2 Реакции (I)–(XVI) | $1,0 \times 10^{-10}$ | $1,9 \times 10^{-14}$ | $5,1 \times 10^{-9}$ | $4,0 \times 10^{-9}$ | $9,2 \times 10^{-5}$ | $4,2 \times 10^{-4}$ |
| + [RVT – GSH] Реакции (I)–(XIX) | $0,5 \times 10^{-10}$ | $3,2 \times 10^{-14}$ | $9,6 \times 10^{-9}$ | $5,3 \times 10^{-9}$ | $1,54 \times 10^{-4}$ | $2,2 \times 10^{-4}$ |

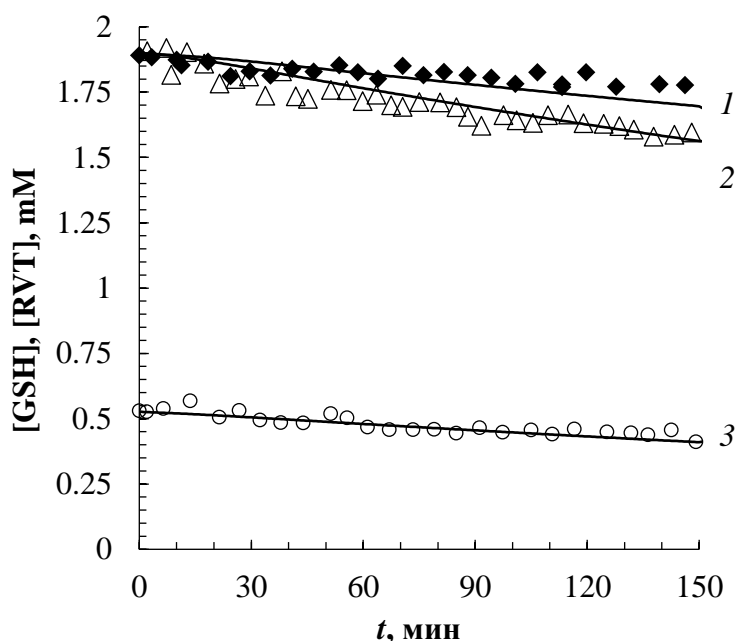


Рисунок 4.17 – Кинетические кривые расходования 1,9 мМ GSH (1, 2, 3) и 0,53 мМ RVT (3) в присутствии 2,1 мМ H_2O_2 : 1 – GSH (\blacklozenge) с RVT; 2 – GSH (Δ) без RVT; водная среда, 37 °С. Точки – экспериментальные данные, сплошные линии – расчетные данные по кинетической модели (Таблица 4.5)

4.4. Ацетилцистеин – кинетический аналог глутатиона в реакциях с активными формами кислорода

В отличие от эндогенных GSH, HSH, CSH, *N*-ацетилцистеин (ASH) – синтетический тиол. ASH используется с конца 1980-х гг. в качестве муколитического и противовоспалительного лекарственного препарата, а также в условиях окислительного стресса при снижении уровня эндогенного глутатиона. Выше (Глава 3) было показано, что по активности в реакциях с пероксильными радикалами ASH занимает промежуточное положение в ряду: HSH > ASH > GSH и является ингибитором средней силы.

Подобно реакциям окисления кислородом, окисление тиолов пероксидом водорода является экзотермическим процессом. На Рисунке 4.18 сопоставлены кинетические кривые тепловыделения при взаимодействии GSH и ASH с H₂O₂, взятых в стехиометрических соотношениях реакции (4.1). Видно, что кинетические кривые практически совпадают, что свидетельствует об относительной автономности связей S–H и S–S в тиолах и дисульфидах, на которые не оказывают влияния другие группы в молекуле.

В деионизированной воде и при pH ≤ 7 ASH в реакции H₂O₂ подобно GSH и другим тиолам генерирует радикалы. Эмпирическая зависимость W_i от концентраций тиола и H₂O₂, измеренная по расходу акцептора А, для ASH имеет вид:

$$W_{iASH} = k [ASH] [H_2O_2]^{1,5}, \quad (4.6)$$

где $k = (7,9 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1} \times \text{М}^{-1,5}$.

На Рисунке 4.19 представлены ЭПР спектры спин-аддуктов DMPO, полученные в буферном растворе с pH 6,2, содержащем 36,9 mM DMPO, 22 mM ASH и 59,6 mM H₂O₂. ЭПР спектр спин-аддукта (1) представляет собой суперпозицию сигналов двух разных нитроксильных радикалов. Один из них нитроксильный радикал, как и в случае с глутатионом, является спин-аддуктом, захватившим OH-радикал, ЭПР спектр которого представлен на Рисунке 4.10, спектр (2). Спектр (2) на Рисунке 4.19 получен вычитанием из суперпозиционного

ЭПР спектра (1) спектра спин-аддукта DMPO-OH. Моделирование данного спектра (3) позволило получить следующие константы СТВ нитроксильного радикала спин-аддукта DMPO-ASN: $a_N = 15,20$ Гс и $a_H = 16,80$ Гс. Эти значения констант СТВ находятся в диапазоне констант, характерных для спиновых аддуктов тиольных радикалов [20; 21; 214], и близки к константам для спинового аддукта DMPO с радикалом L-цистеина ($a_N = 15,2$ Гс и $a_H = 17,5$ Гс) [279].

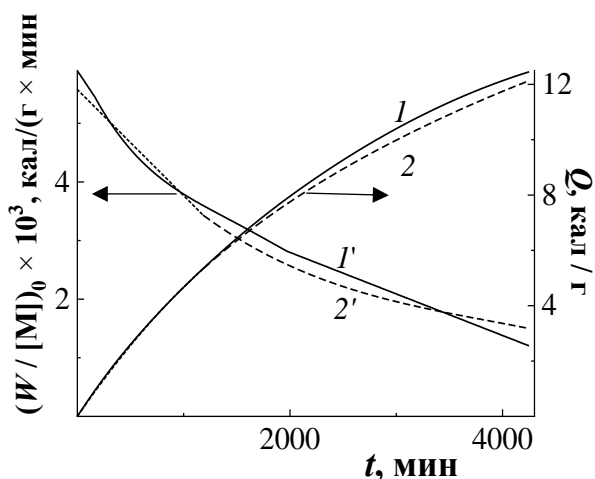


Рисунок 4.18 – Кинетика тепловыделения в реакции NSH (1; 1') и GSH (2; 2') с H_2O_2 в деионизованной воде при $37,7$ °С; концентрации тиолов – $0,1$ М, H_2O_2 – $0,05$ М

Радикалы, образующиеся при взаимодействии ASH с H_2O_2 , могут инициировать цепные процессы. Ресвератрол не взаимодействует с ASH и H_2O_2 , взятых по отдельности, и расходование RVT наблюдается только при их совместном присутствии.

Из Рисунка 4.20, на котором сопоставлены зависимости скорости расходования RVT от его концентрации в растворах ASH и GSH одинаковой концентрации в присутствии $1,5$ мМ H_2O_2 , видно, что для обоих тиолов W_{RVT} линейно возрастает с ростом концентрации RVT в соответствии с уравнением (4.4) [292]. На оси ординат отсекаются отрезки, близкие по величине к скорости инициирования радикалов, измеренной методом ингибиторов по расходованию

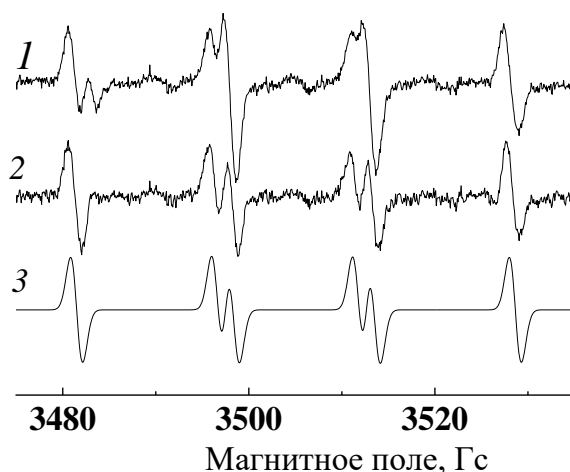
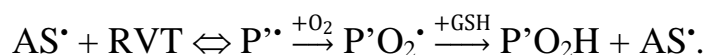


Рисунок 4.19 – ЭПР спектры спиновых аддуктов DMPO, полученных в смеси ASH с H₂O₂: (1) сумма аддуктов; (2) результат вычитания спектра спинового аддукта DMPO с OH-радикалом из спектра (1); (3) модельный спектр, полученный при использовании констант СТВ, указанных в тексте

акцептора А (Таблица 4.7).

Можно ожидать, что тиол-ен реакция ацетилцистеина с ресвератролом происходит в результате радикально-цепного последовательного присоединения тиольного радикала AS[•] и кислорода к RVT:



Из Таблицы 4.7 видно, что значения параметра a , который, согласно уравнению (4.4), характеризует относительную активность ведущих цепи радикалов в продолжении и обрыве цепей, практически одинаковы для ASH и GSH. Это согласуется с измерениями тепловыделения в реакции с H₂O₂ (Рисунок 4.18) и свидетельствует о том, что тиольные группы в ASH и GSH действуют автономно.

Таблица 4.7 – Кинетические характеристики расходования ресвератрола при взаимодействии с глутатионом и *N*-ацетилцистеином (2,5 мМ) в присутствии H₂O₂ (1,5 мМ), водный раствор, 37 °С

| Тиол | pH | W_i^* , М × с ⁻¹ по формулам (4.3) и (4.5) | W_i , М × с ⁻¹ из Рисунка 4.20 | a , (М × с) ^{-0,5} |
|------|------|---|---|-------------------------------|
| GSH | 3,28 | $1,5 \times 10^{-9}$ | $1,4 \times 10^{-9}$ | 0,7 |
| ASH | 3,31 | $1,15 \times 10^{-9}$ | $1,2 \times 10^{-9}$ | 0,8 |

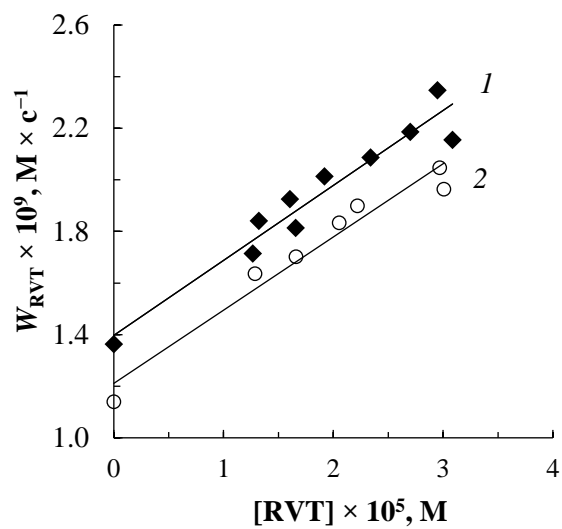


Рисунок 4.20 – Зависимости скорости расходования RVT (W_{RVT}) от концентрации RVT в реакционной смеси 1,5 мМ H_2O_2 с 2,5 мМ тиола: 1 – GSH; 2 – ASH

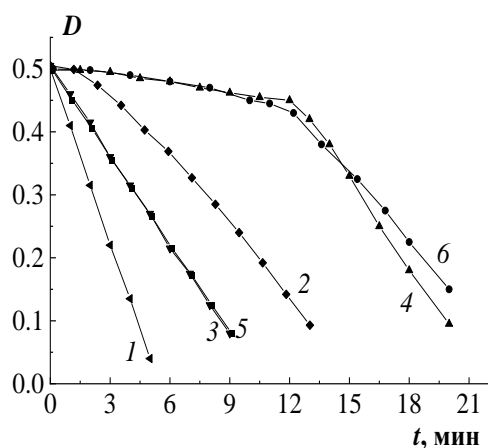
Глава 5. Влияние pH среды и биологически значимых катионов на взаимодействие глутатиона с активными формами кислорода

5.1. Влияние среды на взаимодействие тиолов с пероксильными радикалами

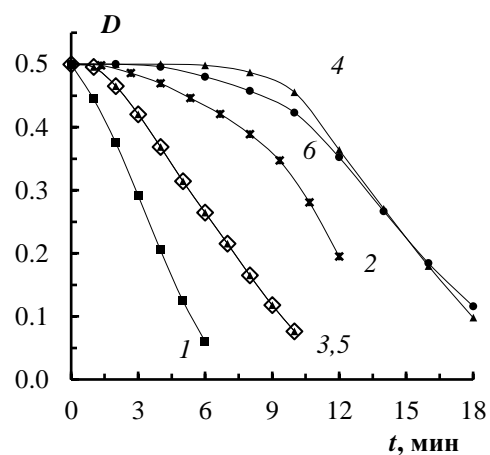
Оценку антирадикальной активности тиолов в реакциях с пероксильными радикалами, образующимися при распаде водорастворимого инициатора AAPH в водном растворе в аэробной среде, проводили методом конкурирующих реакций с акцептором А.

На Рисунках 5.1а–г представлено влияние тиолов глутатиона (GSH), гомоцистеина (HSH), цистеина (CSH) и *N*-ацетилцистеина (ASH) на расходование акцептора А в реакции с радикалами, образующимися в воде и в фосфатных буферных растворах PBS и PB в результате термического распада AAPH при 37 °С. В Главе 2 показано, что в водных растворах акцептор А реагирует с пероксильными радикалами с константой скорости $k_A = 5,4 \times 10^4 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$ и стехиометрическим коэффициентом $f = 1$. Из Рисунка 5.1 видно, что в фосфатных буферных растворах А расходуется с одинаковой скоростью, вдвое меньшей, чем в воде и чем скорость инициирования радикалов (W_i), которая согласно [247; 293] практически не изменяется в интервале pH 5–8. Это означает, что в PBS и PB для А стехиометрический коэффициент $f = W_i / (-d[A] / dt) = 2$. Добавка тиолов (кривая 2, Рисунки 5.1а, б, в) уменьшает скорость расходования А в воде, что свидетельствует об их конкуренции с А. Такие же добавки тиолов в растворах PBS и PB приводят к периодам индукции, по окончании которых, А расходуется практически со скоростью неингибированной реакции (ср. кривые 4 и б с 3 и 5 на Рисунках 5.1а, б, в). Четко выраженные периоды индукции в присутствии сопоставимых по величине с [А] концентраций тиолов свидетельствуют о том, что, во-первых, в PBS и PB, т.е. при pH с 7, тиолы значительно активнее реагируют с радикалами, чем А, и, во-вторых, оба буферных раствора одинаковым образом влияют на антирадикальную активность различным образом влияют на скорость реакции GSH с H₂O₂: в PB более высокая скорость расходования GSH и значительно более низкая скорость образования радикалов,

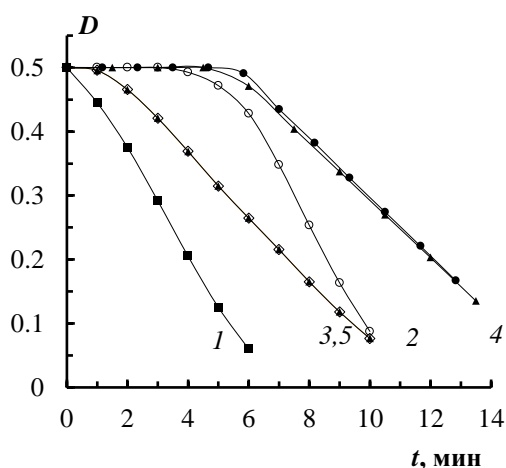
чем в PBS, который содержит больше анионов Cl^- и меньше катионов K^+ по сравнению с PB [274]. Следует отметить, что при одинаковых значениях скорости



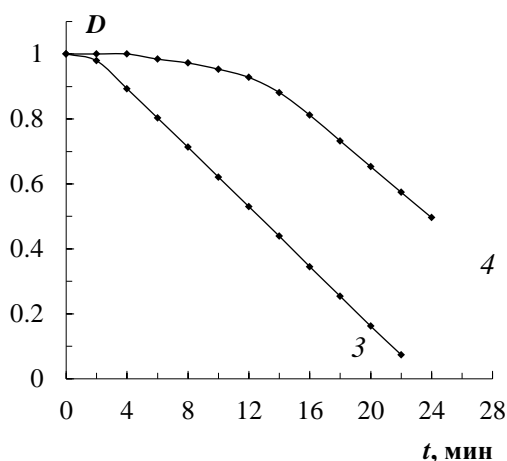
а) GSH в μM : 2 – 15; 4 – 12; 6 – 11



б) HSH в μM : 2 – 9; 4 – 12; 6 – 11



в) CSH в μM : 2 – 10; 4 – 12; 6 – 11



г) $[\text{ASH}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{A}] = 13 \mu\text{M}$

Рисунок 5.1 – Кинетические кривые расходования $6,5 \mu\text{M}$ акцептора **A** в реакции с радикалами, образующимися при распаде 18 mM AAPH в воде (1, 2), PBS pH 7,4 (3, 4) и фосфатном буферном растворе PB pH 7,2 (5, 6) в отсутствие тиолов (1, 3, 5) и с добавками тиолов глутатиона (а), HSH (б), CSH (в) и NSH (г)

инициирования радикалов W_i , и концентрациях тиолов $11\text{--}12 \mu\text{M}$ периоды индукции (τ) в среде PBS и PB уменьшаются в ряду $\tau_{\text{GSH}} > \tau_{\text{HSH}} > \tau_{\text{CSH}}$. Оценка стехиометрического коэффициента f для тиолов по формуле $f = (W_i \times \tau) / [\text{TSH}]$ на основе данных Рисунка 5.1 показывает, что для GSH $f = 1$, для HSH и ASH $f \cong 0,9$, а для CSH $f \cong 0,7$. Относительное уменьшение стехиометрического коэффициента взаимодействия с радикалами при повышенных pH ≥ 7 , по-видимому, связано с дополнительным расходованием тиолов в реакциях с кислородом воздуха.

5.2. Влияние pH среды на взаимодействие глутатиона с пероксидом водорода

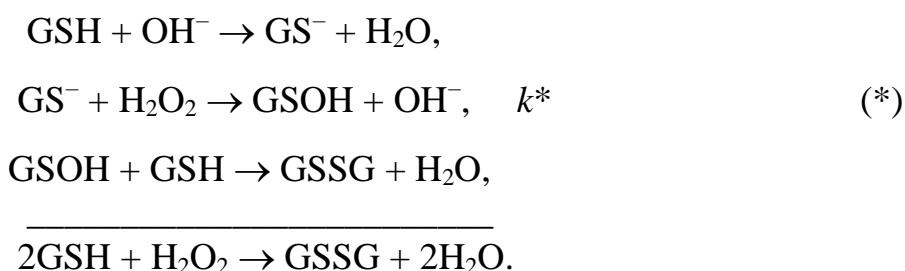
В последнее десятилетие большое внимание уделяют сигнальной роли глутатиона, часто в сочетании с H_2O_2 , в регулировании окислительного стресса и организации ответа живых организмов на внешние воздействия. Молекула GSH содержит две карбоксильных группы с pKa 2,5 и 3,7 (Рисунок 1.2). Поэтому в воде GSH образует кислые растворы ($pH \ll 7$), а в щелочных растворах смещает pH в кислую сторону.

Выше на Рисунке 4.7а представлены кинетические кривые расходования GSH в реакции с H_2O_2 в буферных растворах PBS и PB, а на Рисунке 4.7б – кинетические кривые расходования акцептора А в системе GSH с H_2O_2 при тех же условиях. Аналогичные эксперименты были проведены для других эндогенных тиолов цистеина и гомоцистеина, а в Таблице 5.1 сопоставлены скорости расходования тиолов (W_{TSH}) и акцептора А (W_i) в этих же средах. Видно, что в фосфатных буферных растворах увеличивается скорость расходования TSH (W_{TSH}) и резко снижается скорость образования радикалов. Одной из причин увеличения W_{TSH} в PBS и особенно в PB, очевидно, является окисление тиолов кислородом воздуха. В буферных растворах израсходовалось больше TSH (CSH – 6–10 мМ, HSH – 6 мМ, GSH – 5 мМ), чем требуется согласно стехиометрии уравнения (4.1), тогда как в воде израсходовалось ≤ 4 мМ.

Таблица 5.1 – Скорости расходования тиолов глутатиона (GSH), гомоцистеина (HSH) и цистеина (CSH) (W_{TSH}) и акцептора А (W_i) при взаимодействии 10 мМ тиола и 2 мМ H_2O_2 в различных средах

| Тиол | Бидистиллят | | PBS | | PB | |
|------|---|---|---|---|---|---|
| | $W_{TSH} \times 10^6,$ $M \times c^{-1}$ | $W_i \times 10^9,$ $M \times c^{-1}$ | $W_{TSH} \times 10^6,$ $M \times c^{-1}$ | $W_i \times 10^9,$ $M \times c^{-1}$ | $W_{TSH} \times 10^6,$ $M \times c^{-1}$ | $W_i \times 10^9,$ $M \times c^{-1}$ |
| GSH | 0,8 | 1,4 | 1,1 | 0,15 | 7,0 | 0,01 |
| HSH | 1,3 | 1,4 | 11 | $\cong 0$ | 84 | $\cong 0$ |
| CSH | 5,3 | 42 | 53 | $\cong 0$ | 268 | $\cong 0$ |

На Рисунке 5.2 представлена нетривиальная зависимость начальной скорости расходования GSH в реакции с H_2O_2 от pH реакционной смеси. Видно, что ближе к pH 7 скорость резко, более, чем на порядок, возрастает и в области pH, близкой к физиологическим значениям pH 6,8–7,4, описывается экспоненциальной зависимостью (Рисунок 5.2б). Это означает, что при $\text{pH} \geq 7$ расходование GSH происходит в основном в реакциях:



В этих реакциях, как и в кислой среде, образуются дисульфид и вода, но лимитирующей стадией является реакция H_2O_2 с тиолат-анионом (*):

$$W_{\text{GSH}} = 2W_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2k^* [\text{GS}^-] [\text{H}_2\text{O}_2]. \quad (5.1)$$

Концентрация тиолат-аниона связана с концентрацией ионов водорода константой равновесия диссоциации глутатиона по связи S-H:



$$K_a = ([\text{GS}^-] [\text{H}^+]) / [\text{GSH}]_0 - [\text{GS}^-]; \quad [\text{GS}^-] = K_a [\text{GSH}] / ([\text{H}^+] + K_a).$$

Подставляя это выражение для $[\text{GS}^-]$ в уравнение (5.1), получаем:

$$W_{\text{GSH}} = (2k^* K_a [\text{GSH}]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]) / ([\text{H}^+] + K_a), \quad (5.2)$$

т.е. в буферном растворе W_{GSH} пропорциональна произведению концентраций глутатиона и пероксида водорода и зависит от концентрации H^+ . Логарифмирование уравнения (5.2) приводит к логарифмической зависимости начальной скорости реакции GSH с H_2O_2 от pH в интервале физиологических значений pH 6,8–7,4, где $K_a / ([\text{H}^+]) \ll 1$ (5.3):

$$\lg W_{\text{GSH}} = \lg (2k^* \times K_a) + \lg ([\text{GSH}]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]_0) - \lg [\text{H}^+] = \text{const} + \text{pH}, \quad (5.3)$$

где $\text{const} = \lg (2k^* \times K_a) + \lg ([\text{GSH}]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]_0)$.

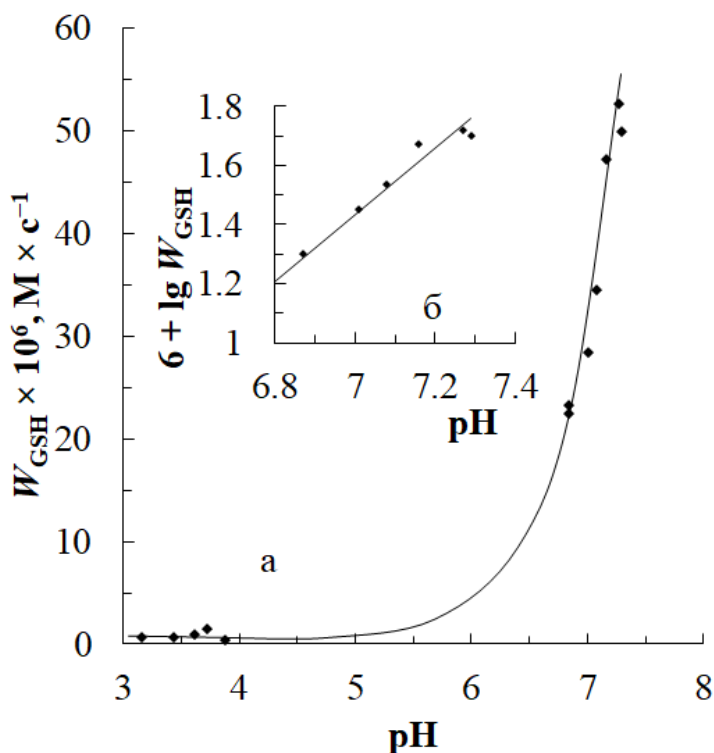


Рисунок 5.2 – а) Влияние pH на скорость расходования 10 мМ GSH в реакции с 2мМ H_2O_2 в натрий-калий фосфатных буферных растворах; б) Зависимость $\lg W_{\text{GSH}}$ от pH в диапазоне pH 6,8–7,4

5.3. Влияние pH среды и биологически значимых катионов на тиол-ен реакцию глутатиона с ресвератролом в присутствии пероксида водорода

В экспериментах, представленных на Рисунке 4.7 и в Таблице 5.1, обращает на себя внимание различное действие фосфатных буферных сред PBS и PB на скорости расходования тиола и образования радикалов при взаимодействии глутатиона с H_2O_2 . На Рисунке 5.3 сопоставлены начальные скорости расходования GSH и А и показано, как меняет pH среды растворение 10 мМ GSH: в деионизированной воде с 7,0 на 3,25, в фосфатно-солевом PBS с 7,4 на 5,2, а в натрий-калиевом фосфатном буфере PB с 7,2 на 6,5. При этом скорость расходования GSH в реакции с 2 мМ H_2O_2 увеличивается с ростом pH, а скорость образования радикалов уменьшается, и при $\text{pH} \geq 7$ радикалы не образуются.

Из Таблицы 5.2 видно, что фосфатные буферные растворы PBS и PB при близких значениях pH сильно отличаются содержанием катионов K^+ и Na^+ , и обращает на себя внимание значительное содержание NaCl и KCl в составе PBS.

При прочих равных условиях W_{GSH} в PBS в 7 раз меньше, чем в PB, не содержащем хлоридов, а W_i в 3 раза выше. В случае HSH и CSH скорости расходования тиолов в PB более, чем на порядок выше, чем в PBS, а радикалы вообще не обнаруживаются (Таблица 5.1).

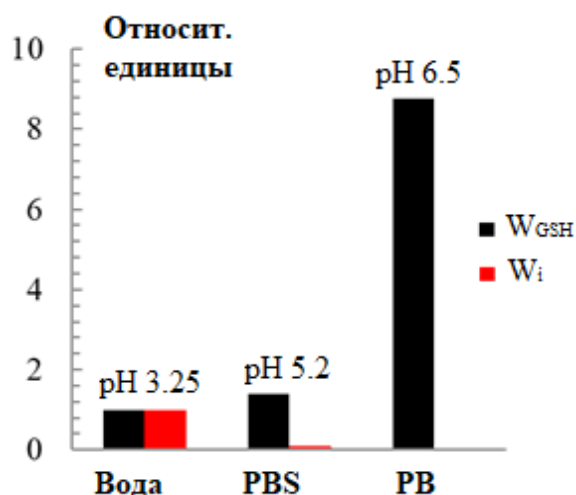


Рисунок 5.3 – Влияние фосфатных буферных растворов PBS и PB на скорости расходования GSH и инициирования радикалов в реакции с H_2O_2

Таблица 5.2 – Ионный состав фосфатных буферных растворов PBS и PB

| PBS, pH 7,4 | | | | PB pH 7,2 | | | |
|---------------------------|------|---------------------------|-------|---------------------------|------|---------------------------|------|
| соль | мМ | ионы | мМ | соль | мМ | ионы | мМ |
| NaCl | 137 | Na^+ | 157 | Na_2HPO_4 | 40,4 | Na^+ | 80,8 |
| KCl | 2,7 | K^+ | 4,46 | KH_2PO_4 | 26 | K^+ | 26 |
| Na_2HPO_4 | 10 | Cl^- | 139,7 | – | – | HPO_4^{2-} | 26 |
| KH_2PO_4 | 1,76 | HPO_4^{2-} | 10 | – | – | H_2PO_4^- | 40,4 |
| – | – | H_2PO_4^- | 1,76 | – | – | – | – |
| Ионная сила | | 0,17 | | Ионная сила | | 0,15 | |

В буферных растворах PBS и PB скорости генерирования радикалов существенно ниже, чем в воде, поэтому можно было ожидать уменьшения скорости тиол-ен реакции GSH с ресвератролом (RVT) в этих средах. На Рисунке 5.4 представлено изменение спектров поглощения RVT при совместном присутствии тиолов и H_2O_2 в воде и буферных растворах PBS и PB. Видно, что в воде скорость

расходования RVT увеличивается в ряду $GSH < HSH < CSH$. В PBS скорость расходования RVT заметно меньше, а в PB RVT практически не расходует. Эти данные согласуются с данными Таблицы 5.1 о резком уменьшении скорости инициирования радикалов при взаимодействии тиолов с H_2O_2 в буферных растворах.

Поскольку мы детально изучили кинетику расходования RVT и GSH в присутствии H_2O_2 в исходно деионизированной воде (см. Главу 4), это позволило, опираясь на полученные данные, как на реперные, провести оценку влияния ионного состава среды, в частности влияния однозарядных биологически значимых катионов, на взаимодействие GSH с H_2O_2 . Акцептор радикалов А представляет собой анионный полиметиновый краситель, поэтому в солевых растворах удобнее использовать нейтральный ресвератрол RVT в качестве спектрально-кинетического зонда для определения скорости инициирования радикалов (W_i).

Необходимо отметить, что в последние годы возобновился интерес к реакциям связывания однозарядных катионов Li^+ , Na^+ , K^+ и органических катионов, производных холина (R_4N^+) с модельными соединениями и биологическими сайтами [294–298] и влияния этих ионов на поведение тиольных радикалов [299]. К производным холина относится важнейший нейромедиатор ацетилхолин (ACh^+), играющий существенную роль в нервно-мышечной и когнитивной активности живых существ [300; 301].

Выше было показано, что зависимость скорости расходования RVT от его концентрации в присутствии GSH и H_2O_2 описывается уравнением цепной реакции с квадратичным обрывом цепей (4.4): $W_{RVT} = W_i + a [RVT] W_i^{0.5}$. На Рисунке 5.5 показано, что скорость расходования RVT (W_{RVT}) в растворах разных солей в присутствии 10 мМ GSH и 2 мМ H_2O_2 линейно возрастает с ростом концентрации RVT, однако линейные зависимости различаются для разных катионов. Согласно уравнению (4.4) на оси ординат отсекаются отрезки, равные W_i . В Таблице 5.3 представлены значения W_i и pH исходного раствора соли и pH реакционной смеси,

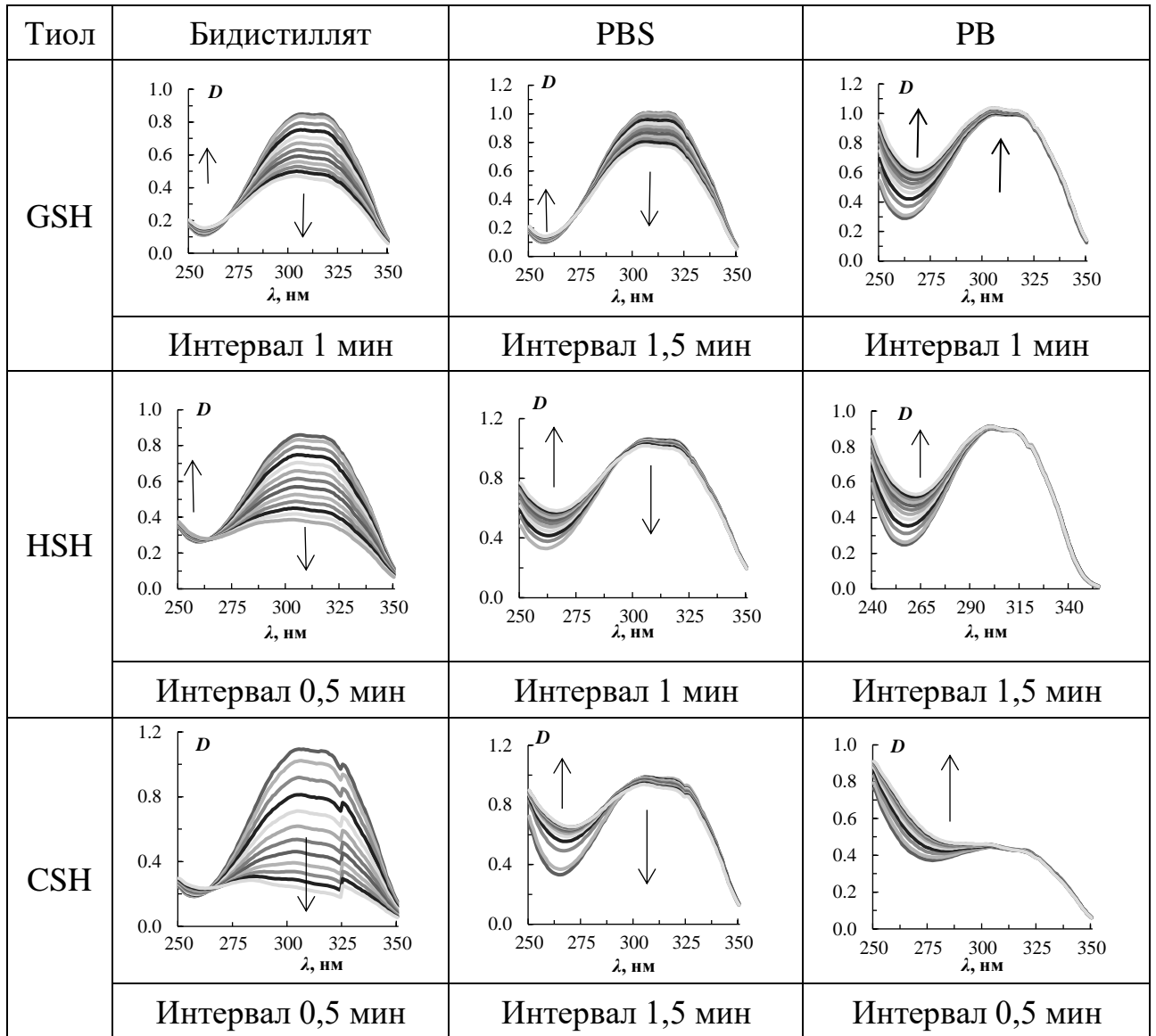
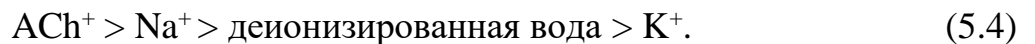


Рисунок 5.4 — Изменение УФ спектров ресвератрола в реакции с 5 мМ тиолов (GSH, HSH, CSH), инициированной 2 мМ H_2O_2 , в бидистилляте PBS и PВ

показывающие, что 10 мМ GSH существенно подкисляют даже буферные растворы. Видно, что в 4 мМ растворах AChCl, NaCl, KCl и деионизированной воде величины W_i уменьшаются в ряду:



Известно, что в органических средах ацетилхолин образует микроагрегаты с гидропероксидами и ускоряет их распад на радикалы, а в водных растворах гидрофильный ACh диссоциирует на тетраалкильный катион и анион Cl^- и не влияет на распад гидропероксидов [302]. Участие ACh в увеличении скорости

образования радикалов в водной среде, которое имеет место в присутствии GSH и H_2O_2 , обнаружено впервые.

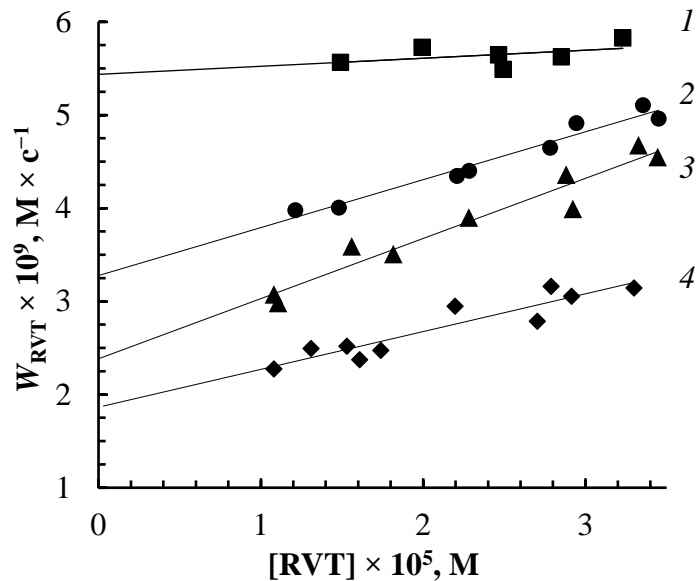


Рисунок 5.5 – Зависимость скорости расщепления RVT (W_{RVT}) от концентрации RVT в реакции 10 мМ GSH с RVT в присутствии 2 мМ H_2O_2 в 4 мМ растворах солей: 1 (□) – AChCl, 2 (●) – NaCl, 3 (▲) – деионизированная вода, 4 (×) – KCl

Таблица 5.3 – Кинетические характеристики расщепления RVT в системе 10 мМ GSH и 2 мМ H_2O_2 в присутствии 4 мМ хлоридов K^+ , Na^+ и ACh^+ и фосфатных буферных смесей, 37 °C

| Соль, 4 мМ | pH раствора | pH реакционной смеси | $W_{RVT} \times 10^9, M \times c^{-1}$ | $a, (M \times c)^{-0.5}$ |
|--------------------|-------------|----------------------|--|--------------------------|
| KCl | 6,15 | 3,04 | 1,9 | 0,95 |
| Вода | 7,0 | 3,10 | 2,4 | 1,3 |
| NaCl | 6,47 | 3,07 | 3,4 | 0,9 |
| AChCl | 4,9 | 3,02 | 5,4 | 0,12 |
| К-фосфатный буфер | 7,43 | 7,29 | 0 | 0 |
| Na-фосфатный буфер | 7,43 | 7,27 | 0 | 0 |

Из Рисунка 5.6 видно, что расщепление при взаимодействии с H_2O_2 небольшой концентрации GSH, при которой pH водного раствора близок к нейтральному, при добавке в раствор AChCl ускоряется по сравнению с расщеплением в чистой воде. В качестве рабочей гипотезы можно предположить, что ACh образует комплексы-микроагрегаты с GSH, в которых облегчается

радикальный распад H_2O_2 , а GSH дополнительно расходуется в реакциях с образующимися радикалами.

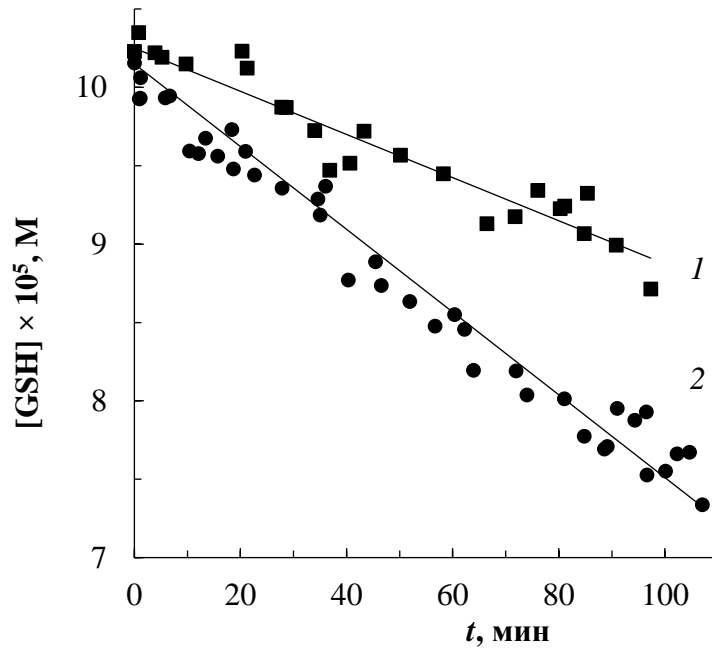


Рисунок 5.6 – Кинетические кривые расходования 0,1 мМ GSH при взаимодействии с 0,002 мМ H_2O_2 в чистой воде (■1) и в 4 мМ водном растворе AChCl (●2), 37 °С

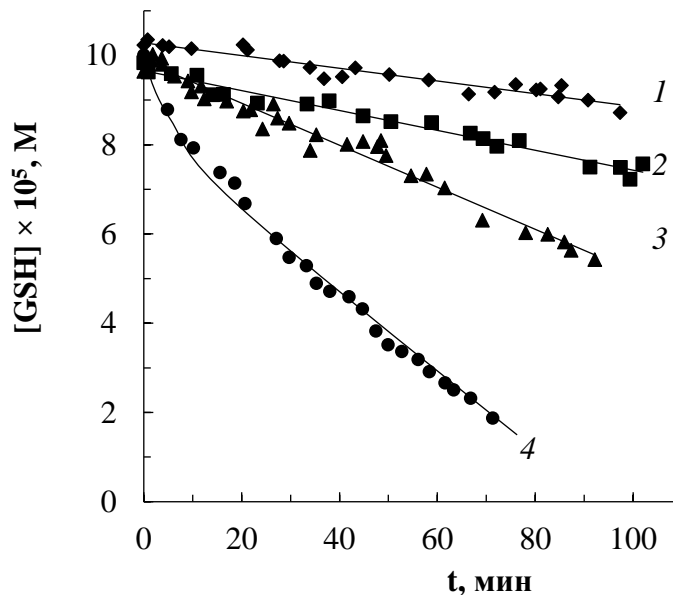


Рисунок 5.7 – Кинетические кривые расходования 0,1 мМ GSH при взаимодействии с 0,02 мМ H_2O_2 в чистой воде (◆1) и в буферных растворах PBS (■2); Na-фосфатном буфере (▲3); K-фосфатном буфере (●4); 37 °С

На Рисунке 5.7 сопоставлено влияние фосфатных буферных систем PBS, Na-фосфатный и K-фосфатный буферы с одинаковыми значениями pH в реакционной

смеси на скорость расходования глутатиона при взаимодействии с H_2O_2 . Так же, как и на Рисунке 5.6, специально взята небольшая концентрация GSH (чтобы можно было подогнать одинаковые рН 7,35) и концентрация H_2O_2 в стехиометрическом

Таблица 5.4 – Скорости расходования GSH и значения рН в реакционной смеси в экспериментах, представленных на Рисунках 5.6 и 5.7

| Среда | рН | $W_{\text{GSH}} \times 10^9, \text{M} \times \text{c}^{-1}$ |
|-----------------------|------|---|
| Деионизированная вода | 6,9 | 2,3 |
| ACh (4мМ) | 4,9 | 4,6 |
| PBS | 7,35 | 4,3 |
| Na-фосфатный буфер | 7,35 | 7,6 |
| К-фосфатный буфер | 7,35 | 19,0 |

соотношении 2 : 1. Видно, что в буферных растворах W_{GSH} значительно больше, чем в деионизированной воде, но неодинакова в буферных растворах с разными катионами. Несмотря на одинаковые рН 7,35, скорость расходования GSH увеличивается в ряду: вода < PBS < Na-фосфатный буфер < К-фосфатный буфер в отношении 1: 1,8 : 3,3 : 8,3.

Таким образом, имеют место сильные различия в кинетике и механизме реакции GSH с H_2O_2 в деионизированной воде и в фосфатных буферных системах при рН ≥ 7 , часто применяемых в биохимических исследованиях. В воде существенную роль в кинетике процесса играет образование димеров GSH и комплексов с H_2O_2 , что проявляется в нелинейных зависимостях скорости расходования GSH (W_{GSH}) и скорости образования радикалов (W_i) от концентраций реагентов. В фосфатных буферных растворах усиливается реакция цепного окисления GSH кислородом воздуха и резко снижается скорость образования радикалов. Полученные данные частично объясняют, почему в огромном количестве публикаций по глутатиону практически никто не упоминает про образование радикалов в реакции GSH с H_2O_2 и про тиол-ен реакции GSH с фенолами, содержащими ненасыщенную связь в боковой цепи. Большие расхождения в количественных характеристиках

активности глутатиона в реакциях с активными формами кислорода могут быть связаны с не учитываемым влиянием отдельных ионов на редокс-активность GSH в этих реакциях. Биологически значимые катионы K^+ специфически влияют на GSH: увеличивают скорость окисления GSH пероксидом водорода и, повидимому, кислородом, но при этом уменьшают выход радикалов в этой реакции по сравнению с водой и другими катионами. В обзоре [303] предлагается и рассматривается гипотеза о том, что незначительные различия в сродстве однозарядных катионов K^+ и Na^+ и электроотрицательных участков биомолекул могут объяснить универсальные особенности живых клеток, а именно, повсеместное доминирование катионов K^+ внутри клеток, в цитоплазме по сравнению с межклеточной средой, где преобладают катионы Na^+ . Автор [303] полагает и обосновывает свое предположение тем, что катионы K^+ , в отличие от Na^+ , имеют сродство с пептидными карбонильными группами в белках и олигопептидах. Поскольку молекула глутатиона включает две пептидных карбонильных группы, полученные нами данные по особому влиянию катионов K^+ на скорость реакции GSH с H_2O_2 , которая включает промежуточное образование молекулярных комплексов, согласуются с этой гипотезой.

Очевидно, благодаря высокой чувствительности пары GSH и H_2O_2 к изменениям среды она занимает центральное место в определении окислительно-восстановительного гомеостаза и редокс-сигнализации [18; 19; 11; 197; 226;].

5.4. Влияние среды на антиокислительные эффекты глутатиона при окислении липидов

Глутатион – сугубо гидрофильный эндогенный антиоксидант, и большинство исследований по биохимии GSH и других природных тиолов проводится в условиях, близких к физиологическим в организмах животных, т. е. в буферных растворах, обеспечивающих pH 7,2–7,4. Мы попросили коллег из Института органической химии Болгарской академии наук в Софии В. Д. Канчеву и А. В. Славову-Казакову провести несколько экспериментов по влиянию глутатиона и

нескольких известных природных антиоксидантов на окисление триглицеридов подсолнечного масла (TGSO) – модельной реакции, которую они широко применяют для тестирования различных природных и синтетических антиоксидантов [48; 304–306].

Из Рисунка 5.8а видно, что GSH не проявляет антиоксидантной активности, ни в обрыве цепей, ни в разрушении липопероксидов, поскольку кинетические кривые накопления пероксидов в окислении при добавках GSH практически такие же, как в контрольном образце. На Рисунке 5.8б для сравнения показано, как влияют на окисление TGSO действительно обрывающие цепь окисления эндогенные фенольные антиоксиданты адреналин, токоферол и эпикатехин в аналогичных условиях. Очевидно, в масляной среде гидрофильный GSH не растворяется, а образует прозрачную дисперсию, частицы которой экранируются сложноэфирными группами TGSO, препятствующими взаимодействию GSH с пероксильными радикалами и гидропероксидами.

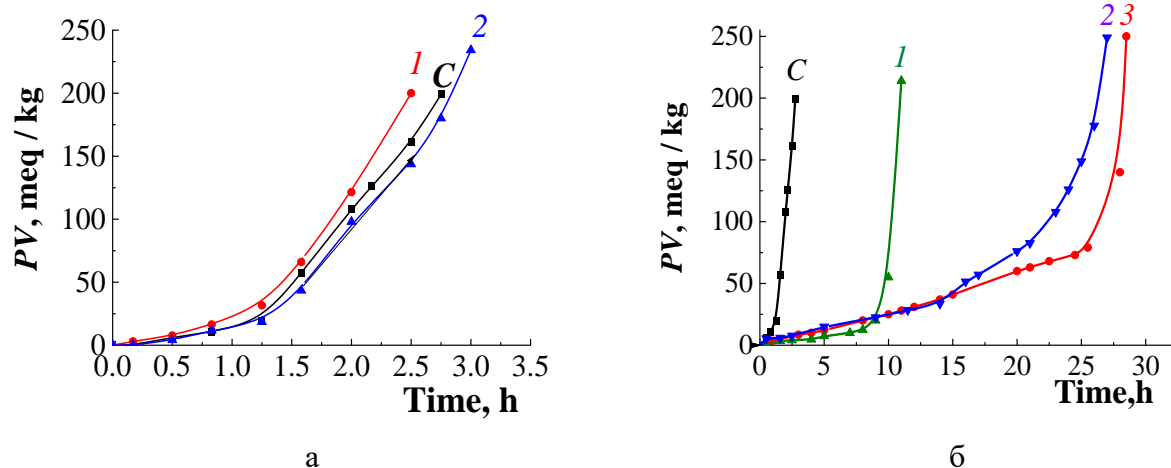


Рисунок 5.8 – Накопление липопероксидов при окислении триглицеридов подсолнечного масла (TGSO) при 80 °С в отсутствие (контроль, С) и в присутствии: а) глутатиона GSH в концентрации 0,1 мМ (1) и 1,0 мМ (2); б) 1 мМ адреналина (1), токоферола (2) и эпикатехина (3) [307]

В живых организмах восстановление гидропероксидов глутатионом происходит ферментативным путем через посредство глутатионпероксидаз, которые помимо всего прочего выполняют функцию межфазного переносчика. Выше (Глава 3) упоминалось, что нам не удалось измерить константу скорости

реакции глутатиона с пероксильным радикалом хемилюминесцентным (ХЛ) методом, основанном на подавлении ХЛ при окислении модельного углеводорода этилбензола, поскольку получилось растворить GSH в этилбензоле.

Окисление метиллинолеата (ЛН) широко используется в качестве модельной реакции для окисления ненасыщенных липидов [28; 32; 57; 247]. Для тестирования различных водорастворимых биоантиоксидантов и их смесей водные мицеллярные растворы ЛН более удобны и успешно используются в качестве кинетической модели биологического процесса перекисного окисления липидов [247]. Недавно [308] была изучена кинетика поглощения кислорода (W_{O_2}) при цепном окислении ЛН в мицеллярных растворах неионного поверхностно-активного вещества Тритон-100 (ТХ-100), инициируемого водорастворимым инициатором 2,2'-азобис (2-метилпропионамид) дигидрохлоридом (AAPH), вплоть до глубоких стадий окисления ЛН. В ходе окисления свежеприготовленного раствора ЛН в мицеллярной системе ТХ-100 наблюдается начальная нестационарная стадия увеличения скорости поглощения кислорода до значения W_{st} , продолжительность которой уменьшается с увеличением количества добавляемого ЛН и скорости инициирования. Эта особенность обусловлена относительно медленными структурными изменениями в мицеллярной системе, которая к моменту достижения W_{st} состоит из смешанных мицелл ТХ-100 с образовавшимися гидропероксидами ($\approx 2\%$ от ТХ-100), в гидрофобной внутренней части которых солюбилизирован ЛН. Такие мицеллы обеспечивают полный перехват радикалов, генерируемых инициатором, локализованным в водной фазе, и цепное соокисление ЛН и ТХ-100 происходит с квадратичным обрывом цепи [309].

Нестационарные участки кинетических кривых изменения скорости поглощения O_2 во времени можно видеть на Рисунке 5.9 а (кривая 1а) и 5.9б (кривая 1б). На Рисунке 5.9 сопоставлено влияние добавок GSH на скорость поглощения O_2 (W_{O_2}) в инициированном водорастворимым инициатором AAPH окислении метиллинолеата, солюбилизированного в мицеллярном растворе ТХ-100, которое проводили в бидистилляте (а) и Na-фосфатном буферном растворе (б) при 37 °С [309].

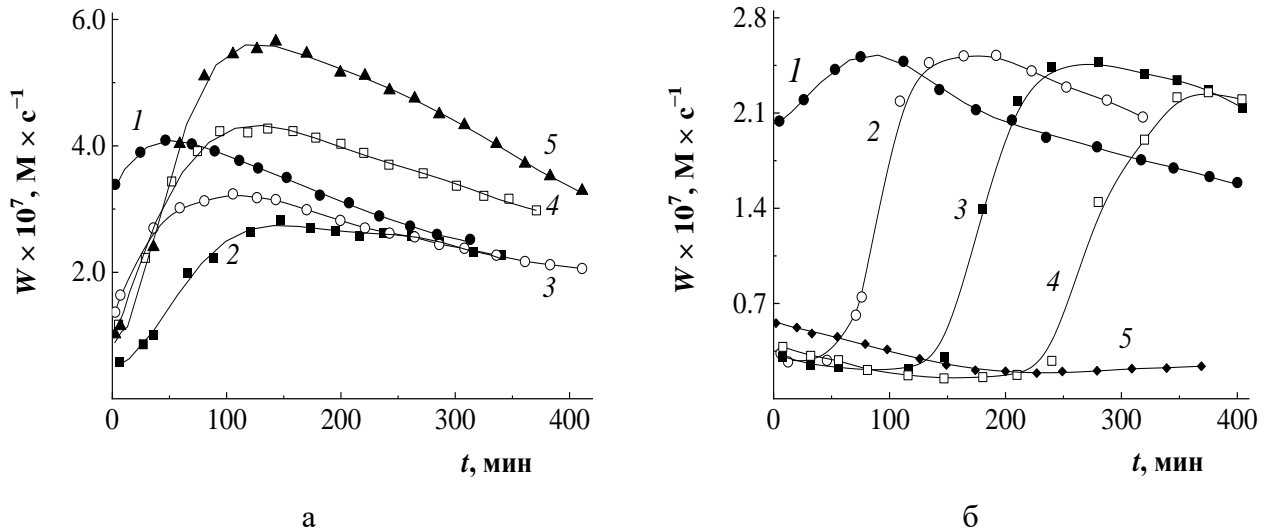


Рисунок 5.9 – Влияние добавок GSH на W_{O_2} при окислении метиллинолеата (10 мМ), инициированного ААРН (4 мМ) в мицеллярном растворе ТХ-100 (50 мМ) в бидистилляте (а) и Na-фосф. буфере (б), 37 °С. Концентрация GSH а) в бидистилляте в мМ: 1 – 0; 2 – 1; 3 – 2; 4 – 5; 5 – 10; б) в Na-фосф. буфере в мМ: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,5; 4 – 1; 5 – 2

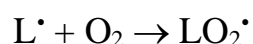
Фосфатный буфер был получен путем смешивания 0,05 М растворов NaH_2PO_4 (Merck) и Na_2HPO_4 (Merck), очищенных от следов металлов переменной валентности с использованием смолы Хелекс-100 (Bio-Rad). Скорости поглощения O_2 во время окисления ЛН в мицеллярном растворе ТХ-100 измеряли с помощью компьютеризированного биологического кислородного монитора компании Yellow Springs Instruments Co. Модель 5300А (США) с электродом Кларка в качестве датчика. Скорость окисления определяли как наклон кинетических кривых уменьшения $[O_2]$ в реакционной смеси.

Мы ожидали, что в буферном растворе при рН 7,4 эффект торможения при добавках GSH будет ярче выражен, поскольку при $pH \geq 7$ возрастает антирадикальная активность тиолов и восстановление гидропероксидов не сопровождается образованием радикалов. Сравнение антиокислительного действия глутатиона при окислении липидов на примере окисления метиллинолеата (ЛН) в системе мицелл ТХ-100, инициированном ААРН, в бидистилляте (Рисунок 5.9а) и в буферном растворе (Рисунок 5.9б) показывает, что, действительно, в фосфатном буферном растворе при одинаковых брутто-концентрациях ААРН, ТХ-100 и ЛН добавки глутатиона обеспечивают более

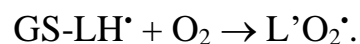
глубокое и длительное торможение, чем в деионизованной воде (наглядно видно из сравнения кривых 3а и 5б с одинаковой добавкой 2 мМ GSH).

Однако следует отметить, что даже в фосфатном буфере стехиометрический коэффициент ингибирования для GSH значительно меньше 1 и уменьшается с увеличением концентрации GSH: 0,13; 0,085; 0,065 (Рисунок 5.9 б), что связано с окислением самого GSH кислородом воздуха.

Необходимо отметить, что в бидистиллате скорость поглощения O_2 при окислении метиллинолеата (LH) с добавками GSH выше, чем W_{O_2} в буферном растворе, а добавки 5 и 10 мМ GSH (кривые 4а и 5а) в бидистиллате приводят к W_{O_2} , превышающей скорость неингибированного процесса (кривая 1а). В буферном растворе такого превышения не наблюдается (Рисунок 5.9б). Мы уже отмечали, что тиольные радикалы, которые образуются в обменных реакциях пероксильных радикалов с GSH, присоединяются к ненасыщенным связям с высокой константой скорости ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$), что на несколько порядков выше константы скорости продолжения цепи при окислении LH ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$). Поэтому добавки тиола могут ускорять окисление LH за счет увеличения скорости продолжения цепи. При этом к звену цепи окисления:



добавляются быстрые реакции:



Из рассмотренных примеров следует, что гидрофильный глутатион оказывает влияние на процессы окисления в водных средах. Эффекты торможения сильно зависят от состава среды и ярче проявляются при физиологических рН 7,2–7,4. При более высоких рН сильно ускоряется окисление самого GSH.

Заключение

В лаборатории жидкофазного окисления Института химической физики имени Н. Н. Семёнова РАН было обнаружено, что взаимодействие тиола меркаптоэтанола с гидропероксидами сопровождается выходом радикалов, которые приводят к ускорению окисления липидов в органической среде. Для того, чтобы выяснить имеет ли место выход радикалов при взаимодействии H_2O_2 с глутатионом, известным, как основной эндогенный биоантиоксидант, кинетика этой реакции была изучена в чистой деионизированной воде с целью исключить влияние примесей переходных металлов и богатых водородом фосфатных ионов в буферных растворах. Образование радикалов было обнаружено, и скорости инициирования радикалов были измерены методом ингибиторов с использованием оригинального акцептора радикалов. Методом спиновой ловушки было показано образование именно тиольных радикалов в реакции глутатиона с H_2O_2 . Выход радикалов низкий ($< 1\%$); однако этого было достаточно, чтобы инициировать цепные тиол-ен реакции между GSH и ненасыщенными соединениями. Детально исследовано взаимодействие GSH с ресвератролом (RVT), растительным фенолом, имеющим ненасыщенную связь в боковом заместителе ароматического кольца, в присутствии H_2O_2 . Скорости потребления GSH (W_{GSH}) и образования радикалов (W_i) в реакции GSH с H_2O_2 чувствительны к значению pH и ионному составу среды. При $\text{pH} \geq 7$ W_{GSH} увеличивается экспоненциально с ростом pH, а W_i резко уменьшается до 0. Поэтому организмы млекопитающих, в клетках и биологических жидкостях которых физиологическое значение pH выше 7,2, защищены от образования радикалов, а глутатион наилучшим образом проявляет антиоксидантные свойства. Однако обнаруженные реакции с участием глутатиона в нейтральной и кислой средах могут быть важны, например, для растений или при использовании глутатиона в виноделии, косметике или пищевых добавках. Системы на основе тиолов выполняют множество функций в клеточном окислительно-восстановительном метаболизме, антиоксидантной защите и передаче сигналов и, следовательно, могут предложить обширный и

разнообразный ассортимент функций для применения в современной синтетической биологии. Количественная информация о реакционной способности тиолов в реакциях с АФК и влиянии компонентов среды на эти реакции является существенным вкладом в реализацию принципов проектирования систем, включающих тиолы.

Основные результаты и выводы

1. Детально изучена кинетика и механизм радикальных реакций природных тиолов с пероксильными радикалами и H_2O_2 в деионизированной воде; определены константы скорости реакций с пероксильными радикалами.

2. С использованием методов ингибиторов и ЭПР установлено образование свободных радикалов при взаимодействии тиолов (глутатиона, цистеина, гомоцистеина, ацетилцистеина) с H_2O_2 в деионизированной воде; при $\text{pH} > 7$ радикалы не образуются.

3. Разработана кинетическая модель тиол-ен реакции глутатиона с фенолом, содержащим ненасыщенную связь в боковой цепи, ресвератролом в присутствии H_2O_2 в деионизированной воде.

4. Установлена зависимость скорости реакций глутатиона и других тиолов с пероксильными радикалами и H_2O_2 от pH : в фосфатных буферных растворах при $\text{pH} \geq 7$ увеличивается конкурентная активность тиолов (TSH) в реакциях с пероксильными радикалами; в диапазоне физиологических pH 6,8–7,4 скорость реакции TSH с H_2O_2 описывается экспоненциальной зависимостью $\lg W_{\text{TSH}} = \text{const} + \text{pH}$.

5. Обнаружено влияние катионов ацетилхолина (ACh^+) и K^+ на взаимодействие GSH и H_2O_2 . Нейромедиатор ацетилхолин более чем в два раза увеличивает, а катионы K^+ , напротив, почти в полтора раза уменьшают скорость образования радикалов при взаимодействии GSH и H_2O_2 .

6. Синтетический тиол *N*-ацетилцистеин близок к природному тиолу глутатиону по кинетическим характеристикам в реакциях с активными формами кислорода в деионизированной воде и может рассматриваться как его кинетический аналог.

7. Предложен анионный полиметиновый краситель с установленными, спектрально-кинетическими характеристиками для оценки антирадикальной активности водорастворимых антиоксидантов и измерения скоростей инициирования радикалов методом ингибиторов.

Список сокращений и условных обозначений

АФК – активные формы кислорода

GSH – глутатион

ASH – ацетилцистеин

H₂O₂ – пероксид водорода

AChCl – ацетилхолин хлорид

DMPO – 5,5-Диметилпирролин-N-оксид

LH – органический субстрат

RH – липид

RO₂[•], rO₂[•] – пероксильный радикал

I – инициатор

W – скорость реакции

W_i – скорость образования радикалов

v – длина цепи

R[•] – алкильный радикал

a – параметр, характеризующий отношение констант скоростей реакций продолжения и обрыва цепи

АО – антиоксидант

InH – ингибитор

f – стехиометрический коэффициент ингибирования

АРА – антирадикальная активность

АОА – антиоксидантная активность

CSH – цистеин

НСН – гомоцистеин

GSSG – дисульфид глутатиона

GSL – глутаматцистеинлигаза

NAPQI – N-ацетил-p-бензохинонимин

HT – реакция отрыва атома водорода

SET – реакции переноса электрона

ΔG° – энергия Гиббса

$\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$ – алкоксильные радикалы

OC – окислительный стресс

$\text{O}_2^{\cdot-}$ супероксид анион радикал

GO – гальвиноксил

DPPH, ДФПГ – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилом

POBN – 4-пиридил-1-оксид трет-бутилнитрона

TSST – дисульфид

TSH – тиол

TSOH – сульфеновая кислота

K_a – константа кислотной диссоциации связи

I – ионная сила раствора

RVT – ресвератрол, 3,5,4'-тригидроксистильбен

CA – кофейная кислота

AAPH – азоинициатор, 2,2' – азобис(2-амидинопропан) гидрохлорид

AIBN – инициатор азо-бис-изобутиронитрил

SOTS-1 – 4,4'-[азобис(оксиметилен)]бис-бензойная кислота, источник супероксид анион-радикалов

DTNB – реактив Элмана, 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота

ϵ – коэффициент экстинкции

A – анионный полиметиновый краситель

D – оптическая плотность

TEMPO – (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил

λ – длина волны

W_A – скорость расходования акцептора радикалов - полиметинового красителя

PhOH – фенол

PhO \cdot – феноксильный радикал

W_{PhOH} – скорость расходования фенола

ХЛ – хемилюминисценция

W_{GSH} – скорость расходования глутатиона

e – выход радикалов

PBS – изотонический натрий-солевой фосфатный буфер (pH 7,4)

PВ – натрий-калиевый фосфатный буфер, используемый в потенциометрическом методе анализа (pH 7,2)

GS[•] – тиольные радикалы глутатиона

[•]ОН – гидроксильный радикал

СА – кофейная кислота

W_{RVT} – скорость расходования ресвератрола

PO₂H – гидропероксид, образующийся в результате последовательного присоединения тиольного радикала глутатиона и кислорода к ненасыщенной связи ресвератрола

P – продукт присоединения тиольного радикала GS[•] к двойной связи RVT в боковой цепи

W_{IASH} – скорость инициирования радикалов в реакции ацетилцистеина с пероксидом водорода

AS[•] – тиольные радикалы N-ацетилцистеина

τ – период индукции

R₄N⁺ – производные холина

TGSO – триглицериды подсолнечного масла

TX-100 – неионное поверхностно-активное вещество Тритон-100

W_{st} – стационарная скорость поглощения кислорода

W_{O₂} – скорость поглощения кислорода

Список литературы

1. Эмануэль, Н. М. Роль свободных радикалов в радиобиологических процессах и некоторые новые возможности разработки средств против лучевого поражения / Н. М. Эмануэль. // Труды МОИП. – 1963. – Т. 7. – С. 73–83.
2. Эмануэль, Н. М. Количественные основы клинической онкологии / Н. М. Эмануэль, Л. С. Евсеенко. – М. : Медицина, 1970. – 264 с.
3. Эмануэль, Н. М. Некоторые молекулярные механизмы и перспективы профилактики старения / Н. М. Эмануэль // Известия Академии наук СССР. Серия биологическая. – 1975. – № 4. – С. 503.
4. Эмануэль, Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов / Эмануэль Н. М. – М. : Наука, 1977. – 416 с.
5. Эмануэль, Н. М. Химическая и биологическая кинетика / Н. М. Эмануэль // Успехи химии. – 1981. – Т. 50, № 10. – С. 1721.
6. Эмануэль, Н. М. Биофизические аспекты действия физических и химических факторов на живые организмы. Защитные свойства антиоксидантов / Н. М. Эмануэль // Биофизика. – 1984. – Т. 29, № 4. – С. 706.
7. Гадомская, А. В. Модельная оценка токсичности хинонных соединений вследствие их атаки на белковые SH-группы / А. В. Гадомская, В. Т. Варламов // Химический журнал «Бутлеровские сообщения». – 2010. – Т. 23, № 14. – С. 62-65.
8. Hopkins, F. G. On an Autoxidisable Constituent of the Cell / F. G. Hopkins // Biochemical Journal. – 1921. – Vol. 15, № 2. – P. 286–305.
9. Winterbourn, C. C. Thiol chemistry and specificity in redox signaling / C. C. Winterbourn, M. B. Hampton // Free Radical Biology and Medicine. – 2008. – V. 45, № 5. – P. 549–561.
10. Winterbourn, C. C. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide / C. C. Winterbourn, D. Metodiewa // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 27, № 3–4. – P. 322–328.
11. Winterbourn C. C. Revisiting the reactions of superoxide with glutathione and other thiols / C. C. Winterbourn // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2016. – Vol. 595. – P. 68–71.

12. Winterbourn, C. C. Reaction of superoxide with glutathione and other thiols / C. C. Winterbourn, D. Metodieva // *Methods Enzymology*. – 1995. – Vol. 251. – P. 81–86.
13. Winterbourn, C. C. Superoxide dismutase as an inhibitor of reactions of semiquinone radicals / C. C. Winterbourn, J. K. French, R. F. Claridge // *FEBS Letters*. – 1978. – Vol. 94, № 2. – P. 269–272.
14. Munday, R. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism / R. Munday, C. C. Winterbourn // *Biochemical Pharmacology*. – 1989. – Vol. 38, № 24. – P. 4349–4352.
15. Winterbourn, C. C. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid / C. C. Winterbourn, S. O. Brennan // *Biochemical Journal*. – 1997. – Vol. 326, № 1. – P. 87–92. doi:10.1042/bj3260087.
16. Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species / C. C. Winterbourn // *Nature Chemical Biology*. – 2008. – Vol. 4. – P. 278–286.
17. Winterbourn, C. C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide / C. C. Winterbourn // *Methods in Enzymology*. – 2013. – Vol. 528. – P. 3–25.
18. Winterbourn, C. C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? / C. C. Winterbourn // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 80. – P. 164–170.
19. Winterbourn, C. C. Biological Production, Detection and Fate of Hydrogen Peroxide // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2017. – Vol. 29, № 6. – P. 541–551. DOI: 10.1089/ars.2017.7425.
20. Takashima, M. Reactivity toward oxygen radicals and antioxidant action of thiol compounds / M. Takashima, M. Shichiri, Y. Hagihara, Y. Yoshida, E. Niki // *Biofactor*. – 2012. – Vol. 38, № 3. – P. 240–248. DOI: 10.1002/biof.1014
21. Stoyanovsky, D. A. Assessments of thiyl radicals in biosystems: difficulties and new applications / D. A. Stoyanovsky, A. Maeda, J. L. Atkins, V. E. Kagan // *Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 83, № 17. – P. 6432–6438.
22. Abedinzadeh, Z. Kinetic study of the oxidation mechanism of glutathione by hydrogen peroxide in neutral aqueous medium / Z. Abedinzadeh, M. Gardès-Albert, C. Ferradini // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1989. – Vol. 67, № 7. – P. 1247–1255.

23. Berges, J. Theoretical study of the structure of the glutathione-hydrogen peroxide complex / J. Berges, J. Caillet, J. Langlet, Z. Abedinzadeh // *Theoretica chimica acta*. – 1993. – Vol. 85. – P. 87–99. <https://doi.org/10.1007/BF01374579>.
24. Abedinzadeh, Z. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest / Z. Abedinzadeh // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2001. – Vol. 79, № 2. – P. 166–170.
25. Luo, D. Kinetics and Mechanism of the Reaction of Cysteine and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution / D. Luo, S. W. Smith, B. D. Anderson // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2005. – Vol. 94, № 2. – P. 304–316.
26. Turunc, O. The thiol-ene (click) reaction for the synthesis of plant oil derived polymers / O. Turunc, M. A. R. Meier // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2012. – Vol. 115, № 1. – P. 41–54. DOI: 10.1002/ejlt.201200148.
27. Семенов, Н. Н. Цепные реакции / Н. Н. Семенов. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : Наука, 1986. – 535 с.
28. Эмануэль, Н. М. Торможение процессов окисления жиров / Н. М. Эмануэль, Ю. Н. Лясковская. – М. : Пищепромиздат, 1961. – 359 с.
29. Эмануэль, Н. М. Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе / Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов, З. К. Майзус. – М. : Наука, 1965. – 375 с.
30. Эмануэль, Н. М. Окисление этилбензола: (Модельная реакция) / Н. М. Эмануэль, Д. Гал; отв. ред. И. В. Березин. – М. : Наука, 1984. – 376 с.
31. Denisov, E. Handbook of antioxidants: bond dissociation energies, rate constants, activation energies and enthalpies of reactions / E. Denisov, T. Denisova. – Boca Raton : CRC press, 2000. – 289 p.
32. Denisov, E. T. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology / E. T. Denisov, I. V. Afanas'ev. – Boca Raton [etc.] : Taylor & Francis, 2005. – 981 с.
33. Денисов, Е. Т. Ингибирование цепных реакций. Монография / Е. Т. Денисов, В. В. Азатян. – Черногловка : Изд-е РАН, 1997. – 268 с.
34. Рогинский, А. П. Фенольные антиоксиданты / А. П. Рогинский. – М. : Наука, 1988. – 247 с.

35. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. Монография / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков, И. А. Бондарь, Н. Ф. Круговых, В. А. Труфакин. – М. : Фирма "Слово", 2006. – 556 с.
36. Cadenas, E. Handbook of Antioxidants / E. Cadenas, L. Packer (Eds.). – New York (USA) : Marcel Dekker, 1996.
37. Shahidi, F. Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects and Applications / F. Shahidi (Ed.). – Champaign, IL (USA) : AOCS Press, 1997. – 401 p.
38. Pokorny, J. Antioxidants in Food: Practical Applications / J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.). – Cambridge (UK) : CRC Press, Woodhead Publ Ltd, 2001. – 351 p.
39. Kamal-Eldin, A. Lipid Oxidation Pathways / A. Kamal-Eldin (Ed.). – New York : AOCS Publishing, 2003. – 323 p.
40. Frankel, E. N. Lipid Oxidation / E. N. Frankel – Second Edition – England (UK) : The Oily Press, PJ Barnes & Associates, 2005. – 486 p.
41. Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications / M. S. Brewer // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2011. – Vol. 10, № 4. – P. 221–247.
42. Sies, H. Oxidative Stress / H. Sies. – London : Academic Press, 1985. – 507 p.
43. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants / H. Sies // Experimental Physiology. – 1997. – Vol. 82, № 2. – P. 291.
44. Sies, H. Oxidative stress / H. Sies, D. P. Jones // Encyclopedia of Stress. – 2007. – Vol. 3. – P. 45–48.
45. Guzman, J. N. Oxidant stress evoked by pace making in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1 / J. N. Guzman, J. S. Padilla, D. Wokosin, J. Kondapalli, E. Ilijic, P. T. Schumacker, D. J. Surmeier // Nature. – 2010. – Vol. 468. – P. 696. doi:10.1038/nature09536.
46. Garg, G. *N*-acetyl-L-cysteine attenuates oxidative damage and neurodegeneration in rat brain during aging / G. Garg, S. Singh, A. K. Singh, S. I. Rizvi // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2018. – Vol. 96, № 12. – P. 1189. doi.org/10.1139/cjpp-2018-0209.

47. West, X. Z. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands / X. Z. West, N. L. Malinin, A. A. Merkulova, M. Tischenko, B. A. Kerr, E. C. Borden, E. A. Podrez, R. G. Salomon, T. V. Byzova // *Nature*. – 2010. – Vol. 467. – P. 972. doi:10.1038/nature09421
48. Kancheva, V. D. Bio-antioxidants – a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health / V. D. Kancheva, O. T. Kasaikina // *Current Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 20, № 37. – P. 4784.
49. Писаренко, Л. М. Кинетическая модель окисления лимонена / Л. М. Писаренко, Д. А. Круговов, А. Н. Щеголихин, О. Т. Касаикина // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2008. – №1. – С. 80.
50. Halliwell, B. The definition and measurements in biological systems / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1995. – Vol. 18, № 1. – P. 125.
51. Young, I. S. Antioxidants in health and disease / I. S. Young, J. V. Woodside // *Journal of Clinical Pathology*. – 2001. – Vol. 54. – P. 176–186.
52. Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine* / B. Halliwell, J. C. Gutteridge – Oxford : Oxford Univ. Press, 2007. – 905 p.
53. Vertuani, S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview / S. Vertuani, A. Angusti, S. Manfredini // *Current Pharmaceutical Design*. – 2004. – Vol. 10, № 14. – P. 1677–1694.
54. Анисимов, И. Г. Топлива, Смазочные материалы, технические жидкости. Ассортимент и применение: Справочник / И. Г. Анисимов, К. М. Бадыштова, С. А. Бнатов, Ш. К. Богданов, Т. И. Богданова, С. Б. Борщевский, В. В. Булатников, Е. М. Бушуева, К. Э. Гаитов, И. Б. Грудников, Е. Е. Довгополый, С. Ю. Дубровский, В. Е. Емельянов, Ю. Л. Ищук, И. О. Колесник, Н. И. Корох, В. В. Куцевалов, И. В. Лендьел, Т. Н. Митусова, Т. И. Назарова, Е. А. Никитина, В. Д. Резников, Л. А. Садовникова, В. В. Фрязинов, А. А. Фуфаев, А. Ф. Хурумова, Г. И. Чередниченко, Т. Н. Шабалина, С. З. Шейнина, Т. В. Шестаковская, Ю. Н. Шехтер, Б. А. Энглин; под ред. В. М. Школьников. – М. : Издательский центр «Техинформ», 1999. – 596 с.

55. Шопов, Л. М. Механизм действия ингибиторов – разрушителей пероксидов / Л. М. Шопов, С. К. Иванов. – София : Изд-во БАН, 1988. – 186 с.
56. Денисов, Е. Т. Реакционная способность природных фенолов / Е. Т. Денисов, Т. Г. Денисова // Успехи химии. – 2009. – Т. 78, № 11. – С. 1129–1155.
57. Roginsky, V. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food / V. Roginsky, E. A. Lissi // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 92, № 2. – P. 235–254.
58. Шляпинтох, В. Я. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов / В. Я. Шляпинтох, О. Н. Карпухин, Л. М. Постников, И. В. Захаров, А. А. Вичутинский, В. Ф. Цепалов – М. : Наука, 1966. – 300 с.
59. Русина, И. Ф. Хемилюминесцентные методы в исследовании ингибированного окисления / И. Ф. Русина, О. Н. Карпухин, О. Т. Касаикина // Химическая физика. – 2013. – Т. 32, № 8. – С. 49.
60. Vos, O. Role of endogenous thiols in protection / O. Vos // Advances in Space Research. – 1992. – Vol. 12, № 2–3. – P. 201–207.
61. Bump, E. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells invitro and in vivo / E. Bump, J. M. Brown // Pharmacology & Therapeutics. – 1990. – Vol. 47, № 1. – P. 117–136.
62. Ba, L. A. Role of Cysteine / L. A. Ba, T. Burkholz, T. Schneider, C. Jacob // Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Analysis and Function of Amino Acids and Peptides. – 2011. – Vol. 5. – P. 361–394. doi:10.1002/9783527631841.ch10
63. Poole, L. B. / The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry / L. B. Poole // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 80. – P. 148–157.
64. Макаров, С. В. Новые направления в химии серосодержащих восстановителей / С. В. Макаров // Успехи химии. – 2001. – Т. 70, № 10. – С. 996–1007.
65. Hawkiks, W. L. Synergistic Antioxidant Combinations. Carbon Black Substitutes / W. L. Hawkiks, M. A. Worthikgston // Journal of Polymer Science Part A: General Papers. – 1963. – Vol. 1, № 11. – P. 3489–3497.

66. Ulrich, K. The role of thiols in antioxidant systems / K. Ulrich, U. Jakob // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 140. – P. 14–27.
67. Maender, O. W. Alkylthio-and aryl (heteroyl) thio-substituted p-phenylenediamines, their manufacture and their use in rubber / O. W. Maender, C. J. Rostek, A. R. Katritzky, H. H. Odens, M. V. Voronkov // U.S. Patent No. 7,718,722 B2, 2010.
68. Aruoma, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease / O. I. Aruoma // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1998. – Vol. 75, № 2. P. 199–212.
69. Sajewicz, W. Comparative study on thiol drugs' effect on tert-butyl hydroperoxide induced luminol chemiluminescence in human erythrocyte lysate and hemoglobin oxidation / W. Sajewicz, M. Zalewska, H. Milnerowicz // *Toxicology in Vitro*. – 2015. – Vol. 29, №1. – P. 149–154.
70. Altıntaş, A. High-resolution kinetics and modeling of hydrogen peroxide degradation in live cells / A. Altıntaş, K. Davidsena, C. Gardea, U. H. Mortensena, J. C. Brasen, T. Sams C. T. Workman // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 101. – P. 143–153.
71. Wang, Y. Molecular mechanism of glutathione-mediated protection from oxidized low-density lipoprotein-induced cell injury in human macrophages: Role of glutathione reductase and glutaredoxin / Y. Wang, M. Qiao, J. J. Mieyal, L. M. Asmis, R. Asmis // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 41, № 5. – P. 775–785.
72. Meister, A. Glutathione / A. Meister, M. E. Anderson // *Annual Review of Biochemistry*. – 1983. – Vol. 52. – P. 711–760.
73. Kheirabadi, R. / Computational modeling of the catalytic cycle of glutathione peroxidase nanomimic / R. Kheirabadi, M. Izadyar // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2016. – V. 120, № 51. – P. 10108–10115. DOI: 10.1021/acs.jpca.6b11437.
74. Kosower, N. S. The Glutathione Status of Cells' / N. S. Kosower, E. M. Kosower // *International review of cytology*. – 1978. – Vol. 54. – P. 104–160.

75. Aquilano, K. Glutathione: New roles in redox signaling for an old antioxidant / K. Aquilano, S. Baldelli, M. R. Ciriolo // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – Vol. 5, № 196. – P. 1–12.
76. Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions / H. Sies // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1999. – Vol. 27, № 9–10. – P. 916–921.
77. Schafer, F. Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple / F. Q. Schafer, G. R. Buettner // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2001. – Vol. 11, № 30. – P. 1191–1212.
78. Mironczuk-Chodakowska, I. / Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body / I. Mironczuk-Chodakowska, A. M. Witkowska // *Advances in Medical Sciences* – 2018. – Vol. 63, № 3. – P. 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
79. Guan, X. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples / X. Guan, B. Hoffman, C. Dwivedi, D. P. Matthees // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2003. – Vol. 31, № 2. – P. 251–261.
80. Bakavayev, S. Cu/Zn-superoxide dismutase and wild-type like fALS SOD1 mutants produce cytotoxic quantities of H₂O₂ via cysteine-dependent redox short-circuit / S. Bakavayev, N. Chetrit, T. Zvagelsky, R. Mansour, M. Vyazmensky, Z. Barak, A. Israelson, S. Engel // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1–13. [doi:10.1038/s41598-019-47326-x](https://doi.org/10.1038/s41598-019-47326-x)
81. Aoyama, K. Glutathione in the Brain / K. Aoyama // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22095010>.
82. Monograph. Glutathione, Reduced (GSH) // *Alternative Medicine Review*. – 2001. – Vol. 6, № 6. – P. 601–607.
83. Wu, G. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health / G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, N. D. Turner // *The Journal of Nutrition*. – 2004. – Vol. 134, № 3. – P. 489–492.

84. Giustarini, D. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells / D. Giustarini, G. Colombo, M. L. Garavaglia, E. Astori, N. M. Portinaro, F. Reggiani, S. Badalamenti, A. M. Aloisi, A. Santucci, R. Rossi, A. Milzani, I. Dalle-Donne // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 112. – P. 360–375.
85. Lushchak V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions / V. I. Lushchak // *Journal of Amino Acids*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 736837. – P. 1–26. doi :10.1155/2012/736837
86. Калинина, Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // *Успехи биологической химии*. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
87. Sen, C. K. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction / C. K. Sen // *Current Topics in Cellular Regulation*. – 2000. – Vol. 36. – P. 1–30.
88. Penninckx, M. J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2000. – Vol. 26, № 9–10. – P. 737–742.
89. Anderson, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation / M. E. Anderson // *Chemico-Biological Interactions*. – 1998. – Vol. 111–112. – P. 1–14.
90. Messens, J. / Thiol–Disulfide Exchange in Signaling: Disulfide Bonds As a Switch / J. Messens, JF. Collet // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – Vol. 18, № 13. – P. 1594–1596. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5156>
91. Albrecht, S. C. In Vivo Mapping of Hydrogen Peroxide and Oxidized Glutathione Reveals Chemical and Regional Specificity of Redox Homeostasis / S. C. Albrecht, A. G. Barata, J. Großhans, A. A. Teleman, T. P. Dick // *Cell Metabolism*. – 2011. – Vol. 14, № 6. – P. 819–829.
92. Mukwevho, E. Potential Role of Sulfur-Containing Antioxidant Systems in Highly Oxidative Environments / E. Mukwevho, Z. Ferreira, A. Ayeleso // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19, № 12. – P. 19376–19389.
93. Zhou, Y. Detection of Glutathione in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells With a Fluorescent Probe During the Course of Oxidative Stress and Apoptosis / Y. Zhou,

- S. Huang, H. Shen, M. Ma, B. Zhu, D. Zhang // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2017. – Vol. 75, № 1. – P. 223.e1–223.e10.
94. Gupta, S. Glutathione: Induction apoptosis and autophagy in cancer / S. Gupta, A. N. Sahu // *IJPSR*. – 2020. – Vol. 11, № 8. – P. 3608–3618.
95. Ristoff, E. Inborn errors in the metabolism of glutathione / E. Ristoff, A. Larsson // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2007. – Vol. 2, № 1. – Article number 16. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-16>
96. Jensen, K.S. Kinetic and Thermodynamic Aspects of Cellular Thiol–Disulfide Redox Regulation / K. S. Jensen, R. E. Hansen, J. R. Winther // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2009. – Vol. 11, № 5. – P. 1047–1058.
97. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung / P. Ghezzi // *International Journal of General Medicine*. – 2011. – Vol. 4. – P. 105–113.
98. Harbrecht, B. G. Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes / B. G. Harbrecht, M. D. Silvio, V. Chough, Y. M. Kim, R. L. Simmons, T. R. Billiar // *Annals of Surgery*. – 1997. – Vol. 225, №1. – P. 76–87.
99. Kroemer, G. / Mitochondrial control of cell death / G. Kroemer, J. C. Reed // *Nature Medicine*. – 2000. – Vol. 5, № 6. – P. 513–519.
100. Burtis, A. C. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics / A. C. Burtis, E. R. Ashwood, D. E. Bruns. – 4th edn. – Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1996.
101. White, P. An electrochemical adaptation of Ellman's test / P. White, S. Threlfell, G. Hignett, A. Wain, N. Lawrence, J. Davis, R. Compton // *Analyst*. – 2002. – Vol. 127, № 6. – 797–802.
102. Oliveira, P. V. S. Implications of plasma thiol redox in disease / P. V. S. Oliveira, F. R. M. Laurindo // *Clinical Science*. – 2018. – Vol. 132, № 12. – P. 1257–1280.
103. Bjørklund, G. The impact of glutathione metabolism in autism spectrum disorder / G. Bjørklund, M. D. Doşa, M. Maes, M. Dadar, R. E. Frye, M. Peana, S. Chirumbolo // *Pharmacological Research*. – 2021. – Vol. 166, № 105437. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105437>

104. Estrela, J. M. Glutathione in cancer biology and therapy / J. M. Estrela, A. Ortega, E. Obrador // *Critical Reviews Clinical Laboratory Science*. – 2006. – Vol. 43, № 2. – P. 143–181. DOI: 10.1080/10408360500523878
105. Toyokuni, S. / Iron and thiols as two major players in carcinogenesis: friends or foes? / *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – Vol. 5, Article 200. DOI: 10.3389/fphar.2014.00200
106. Stavrovskaya, A. A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells / A. A. Stavrovskaya // *Biochemistry (Moscow)*. – 2000. – Vol. 65, № 1. – P. 95–106.
107. Guo, R. / Glutathione-induced amino-activatable micellar photosensitization platform for synergistic redox modulation and photodynamic therapy / R. Guo, G. Yang, Z. Feng, Y. Zhu, P. Yang, H. Song, W. Wang, P. Huang, J. Zhang // *Biomater. Sci.* – 2018. – Vol. 6, № 5. – P. 1238–1249. DOI: 10.1039/c8bm00094h
108. Monostori, P. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review / P. Monostori, G. Wittmann, E. Karg, S. Túri // *Journal of Chromatography B*. – 2009. – Vol. 877, № 28. – P. 3331–3346.
109. Giustarini, D. Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures / D. Giustarini, F. Galvagni, A. Tesei, A. Farolfi, M. Zanoni, S. Pignatta, A. Milzani, I. M. Marone, I. Dalle-Donne, R. Nassini, R. Rossi // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 89. – P. 972–981.
110. Conway, J. G. / Carcinogen treatment increases glutathione hydrolysis by γ -glutamyltranspeptidase / J. G. Conway, D. A. Neptun, L. K. Garvey, J. A. Popp // *Carcinogenesis*. – 1987. – Vol. 8, № 7. – P. 999–1004.
111. Chen, Y. / Glutathione and transsulfuration in alcohol-associated tissue injury and carcinogenesis / Y. Chen, M. Han, A. Matsumoto, Y. Wang, D. C. Thompson, V. Vasiliou // *Alcohol and Cancer* – 2018. – P. 37–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98788-0_3
112. Franco, R. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant / R. Franco, J. A. Cidlowski // *Cell Death and Differentiation*. – 2009. – Vol. 16, № 10. – P. 1303–1314.

113. Townsend, D. M. / The importance of glutathione in human disease / D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2003. – Vol. 57, № 3–4. – P. 145–155.
114. Elgawish, M. S. Quinones as novel chemiluminescent probes for the sensitive and selective determination of biothiols in biological fluids / M. S. Elgawish, N. Kishikawab, N. Kurodab // *Analyst*. – 2015. – Vol. 140, № 24. – P. 8148–8156.
115. Sevier, C. S. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells / C. S. Sevier, C. A. Kaiser // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2002. – Vol. 3, № 11. – P. 836–847.
116. Nagano, N. Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins / N. Nagano, M. Ota, K. Nishikawa // *FEBS Letters*. – 1999. – Vol. 458, № 1. – P. 69–71.
117. Pereira, C. D. Free thiol of transthyretin in human plasma most accessible to modification/oxidation / C. D. Pereira, N. Minamino, T. Takao // *Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 87, № 21. – P. 10785–10791.
118. Harman, L. S. Free Radical Metabolites of L-Cysteine Oxidation / L. S. Harman, C. Mottley, R. P. Mason // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1984. – Vol. 259, № 9. – P. 5606–5611.
119. Гайтон, А. К. Медицинская физиология / А. К. Гайтон, Дж. Э. Холл; пер. с англ.; под ред. В. И. Кобрина. – М. : Логосфера, 2008. – 1296 с.
120. Лотош, Н. Ю. Гликирование альбумина *in vitro* при нормальной и повышенной концентрации глюкозы / Н. Ю. Лотош, С. В. Савельев, А. А. Селищева // *Патогенез*. – 2015. – Т. 13, № 2. – С. 42–46.
121. Oettl, K. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties / K. Oettl, R. E. Stauber // *British Journal of Pharmacology*. – 2007. – Vol. 151, № 5. – P. 580–590.
122. Lim, Z. X. Oxidation of cysteine 34 of plasma albumin as a biomarker of oxidative stress / Z. X. Lim, M. N. Duong, A. E. Boyatzis, E. Golden, A. Vrieling, P. A. Fournier, P. G. Arthur // *Free Radical Research*. – 2020. – Vol. 54, № 1. – P. 91–103. doi: 10.1080/10715762.2019.1708347.

123. Lawrence, N. Detection of homocysteine at carbon nanotube paste electrodes / N. Lawrence, R. Deo, J. Wang // *Talanta*. – 2004. – Vol. 63, № 2. – P. 443–449.
124. Refsum, H. Homocysteine and cardiovascular disease / H. Refsum, P. Ueland, O. Nygård, S. Vollset // *Annual Review of Medicine*. – 1998. – Vol. 49. – P. 31–62.
125. Refsum, H. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion / H. Refsum, A. Smith, P. Ueland, E. Nexø, R. Clarke, J. McPartlin, C. C. Johnston, F. Engbaek, J. Schneede, C. McPartlin, J. Scott // *Clinical Chemistry*. – 2004. – Vol. 50, № 1. – P. 3–32.
126. McCully, K. S. Homocysteine Metabolism, Atherosclerosis, and Diseases of Aging / K. S. McCully // *Comprehensive Physiology*. – 2016. – Vol. 6. – P. 471–505.
127. Cattaneo, M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis / M. Cattaneo // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1999. – Vol. 81, № 2. – P. 165–176.
128. Morris, M. S. Homocysteine and Alzheimer's disease / M. S. Morris // *Lancet Neurology*. – 2003. – Vol. 2, № 7. – P. 425–428.
129. Muszalska, D. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients / D. Muszalska, A. Malinowska, J. Olas, B. Giowacki, R. Bald, E. Wachowicz, B. Rabe-Jabiocka // *Neurochemical Research*. – 2012. – Vol. 37. – 1057–1062.
130. Smach, M. A. Folate and homocysteine in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease or dementia: a case control study / M. A. Smach, N. Jacob, J. L. Golmard, B. Charfeddine, T. Lammouchi, L. B. Othman, H. Dridi, S. Bennamou, K. Limem // *European Neurology*. – 2011. – Vol. 65. – P. 270–278.
131. Çelik, N. Protective effect of quercetin on homocysteine-induced oxidative stress / N. Çelik, A. Vurmaz, A. Kahraman // *Nutrition*. – 2017. – Vol. 33. – P. 291–296.
132. Piperno, E. Reversal of experimental paracetamol toxicosis with N-acetylcysteine / E. Piperno, D. A. Berssenbruegge // *The Lancet*. – 1976. – Vol. 308, № 7988. – P. 738–739. doi:10.1016/S0140-6736(76)90030-1.
133. Whyte, I. M. Safety and efficacy of intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen overdose: analysis of the Hunter Area Toxicology Service (HATS)

- database / I. M. Whyte, B. Francis, A. H. Dawson // *Current Medical Research and Opinion*. – 2007 – Vol. 23, № 10. – P. 2359–2368. doi: 10.1185/030079907X219715.
134. Green, J. L. Oral and Intravenous Acetylcysteine for Treatment of Acetaminophen Toxicity: A Systematic Review and Meta-analysis / J. L. Green, K. J. Heard, K. M. Reynolds, D. Albert // *The Western Journal of Emergency Medicine*. – 2013. – Vol. 14, № 3. – P. 218–226. doi:10.5811/westjem.2012.4.6885
135. McClure, E. A. Potential Role of N-Acetylcysteine in the Management of Substance Use Disorders / E. A. McClure, C. D. Gipson, R. J. Malcolm, P. W. Kalivas, K. M. Gray // *CNS Drugs*. – 2014. – Vol. 28, № 2. – P. 95–106. doi:10.1007/s40263-014-0142-x.
136. Smaga, I. N-acetylcysteine as a new prominent approach for treating psychiatric disorders / I. Smaga, M. Frankowska, M. Filip // *British Journal of Pharmacology*. – 2021. – Vol. 178, № 13. – P. 2569–2594. DOI: 10.1111/bph.15456
137. Kamali, M. N-Acetyl Cysteine Loaded-Niosomes as a Mucolytic Agent for Acute Diseases and Respiratory Disorders / M. Kamali, A. Noori, R.S. Soufdoost // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 8957–8968. <https://doi.org/10.33263/BRIAC112.89578968>.
138. Rahimi, A. The efficacy of N-Acetylcysteine in severe COVID-19 patients: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial / A. Rahimi, H. R. Samimaghani, M. H. Azad, D. Hooshyar, M. Arabi, M. KazemiJahromi // *Trials*. – 2021. – Vol. 22, № 271. <https://doi.org/10.1186/s13063-021-05242-4>.
139. Zafarullah, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions / M. Zafarullah, W. Q. Li, J. Sylvester, M. Ahmad // *Cellular and Molecular Life Sciences* – 2003. – Vol. 60, № 1. – P. 6–20.
140. Kelly, G. S. Clinical Applications of N-acetylcysteine / G. S. Kelly // *Alternative Medicine Review*. – 1998. – Vol. 3, № 2. – P.114–127.
141. Monograph. N-acetylcysteine // *Alternative Medicine Review*. – 2000. – Vol. 5, № 5. – P. 467.

142. Smilkstein, M. J. Efficacy of Oral N-Acetylcysteine in the Treatment of Acetaminophen Overdose / M. J. Smilkstein, G. L. Knapp, K. W. Kulig, B. H. Rumack // *The New England Journal Medicine*. – 1988. – Vol. 319, № 24. – P. 1557–1562.
143. Aruoma, O. I. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid / O. I. Aruoma, B. Halliwell, B. M. Hoey, J. Butler // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1989. – Vol. 6, № 6. – P. 593–597.
144. Nagy, P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways / P. Nagy // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – Vol. 18, № 13. – P. 1623–1641.
145. Noszál, B. Population, acid–base, and redox properties of N-acetylcysteine conformers / B. Noszál, D. Visky, M. Kraszni // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2000. – Vol. 43, № 11. – P. 2176–2182.
146. Parker, A. J. Derivatives of sulfenic acids. XXXVI. The ionic scission of the sulfur–sulfur Bond. Part 1 / A. J. Parker, N. Kharasch // *Journal of The American Chemical Society*. – 1960. – Vol. 82, № 4. – P. 3071–3075.
147. Sheffner, A. L. The in vitro reduction in viscosity of human tracheobronchial secretions by acetylcysteine / A. L. Sheffner, E. M. Medler, L. W. Jacobs, H. P. Sarett // *American Review of Respiratory Disease*. – 1964. – Vol. 90, № 5. – P. 721–729.
148. Hurst, G. A. Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine / G. A. Hurst, P. B. Shaw, C. A. LeMaistre // *American Review of Respiratory Disease*. – 1967. – Vol. 96, № 5. – P. 962–970.
149. Zhou, J. Intravenous administration of stable-labeled N-acetylcysteine demonstrates an indirect mechanism for boosting glutathione and improving redox status / J. Zhou, L. D. Coles, R. V. Kartha, N. Nash, U. Mishra, T. C. Lund, J. C. Cloyd // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol. 104, № 8. – P. 2619–2626.
150. Pastore, A. Determination of Blood Total, Reduced, and Oxidized Glutathione in Pediatric Subjects / A. Pastore, F. Piemonte, M. Locatelli, A. L. Russo, L. M. Gaeta, G. Tozzi // *Clinical Chemistry*. – 2001. – Vol. 47, №8. – P. 1467–1469.

151. Hill, B. G. Role of glutathiolation in preservation, restoration and regulation of protein function / B. G. Hill, A. Bhatnagar // *IUBMB Life*. – 2007. – Vol. 59, №1. – P. 21–26.
152. Sonthalia, S. Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies / S. Sonthalia, D. Daulatabad, R. Sarkar // *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. – 2016. – Vol. 82, № 3. – P. 262–272.
153. Park, E. Y. Increase in the Protein-Bound Form of Glutathione in Human Blood after the Oral Administration of Glutathione / E. Y. Park, N. Shimura, T. Konishi, Y. Sauchi, S. Wada, W. Aoi // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 62, № 26. – P. 6183–6189.
154. Watanabe, F. Skin-whitening and skin-condition-improving effects of topical oxidized glutathione: a double-blind and placebo-controlled clinical trial in healthy women / F. Watanabe, E. Hashizume, G. P. Chan, A. Kamimura // *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. – 2014. – Vol. 7. – P. 267–274.
155. Shindo, Y. Antioxidant defence mechanism of the skin against UV irradiation: Study of the role of catalase using acatalasaemia fibroblasts / Y. Shindo, T. Hashimoto // *Archives of Dermatological Research*. – 1995. – Vol. 287. – P. 747–753.
156. Weschawalit, S. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects / S. Weschawalit, S. Thongthip, P. Phutrakool, P. Asawanonda // *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. – 2017. – Vol. 10. – P. 147–153.
157. Kritzinger, E. C. Role of glutathione in winemaking: a review / E. C. Kritzinger, F. F. Bauer, W. J. du Toit // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 2, № 61. – P. 269–277. [dx.doi.org/10.1021/jf303665z](https://doi.org/10.1021/jf303665z).
158. Gambuti, A. Sulfur Dioxide and Glutathione Alter the Outcome of Microoxygenation / A. Gambuti, G. Han, A. L. Peterson, A. L. Waterhouse // *American Journal of Enology and Viticulture*. – 2015. – Vol. 66, № 4. – P. 411–423.
159. Chen, D. Biodegradable, Hydrogen Peroxide, and Glutathione Dual Responsive Nanoparticles for Potential Programmable Paclitaxel Release / D. Chen, G. Zhang, R. Li, M. Guan, X. Wang, T. Zou, Y. Zhang, C. Wang, C. Shu, H. Hong, L. Wan // *Journal of The American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140, № 24. – P. 7373–7376.

160. Saranya, G. A Ratiometric Near-Infrared Fluorogen for the Real Time Visualization of Intracellular Redox Status during Apoptosis / G. Saranya, P. Anees, M. M. Joseph, K. K. Maiti, A. Ajayaghosh // *Chemistry – A European Journal*. – 2017. – Vol. 23, № 30. – P. 7191 – 7195.
161. Markina, M. Nanoparticle-based paper sensor for thiols evaluation in human skin / M. Markina, N. Stozhko, V. Krylov, M. Vidrevich, Kh. Brainina // *Talanta*. – 2017. – Vol. 165. – P. 563–569.
162. Jing, T. Self-Healing Organic Fluorophore of Cyanine-Conjugated Amphiphilic Polypeptide for Near-Infrared Photostable Bioimaging / T. Jing, T. Li, Z. Ruan, L. Yan. // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2018. – Vol. 10, № 17. – P. 14517–14530.
163. Biaglow, J. E. Role of Glutathione and Other Thiols in Cellular Response to Radiation and Drugs / J. E. Biaglow, M. E. Varnes, E. P. Epp, E. P. Clark, S. W. Tuttle, K. D. Held // *Drug Metabolism Reviews*. – 1989. – Vol. 20, № 1. – P. 1–12.
164. Fiser, B. Antioxidant Potential of Glutathione: A Theoretical Study / B. Fiser, M. Szőri, B. Jójárt, R. Izsák, I. G. Csizmadia, B. Viskolcz // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2011. – Vol. 115, № 38. – P. 11269–11277. doi:10.1021/jp2049525.
165. Görbitz, C. H. A redetermination of crystal and molecular structure of glutathione (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine) at 120 K / C. H. Görbitz // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1987. – Vol. B41. – P. 362–366.
166. Picquart, M. Vibrational Spectroscopic Study of Glutathione Complexation in Aqueous Solutions / M. Picquart, L. Grajcar, M. H. Baron, Z. Abedinzadeh // *Biospectroscopy*. – 1999. – Vol. 5, № 6. – P. 328–337.
167. Kharasch, N. Chemistry of biologically active sulfur compounds / N. Kharasch, A. S. Arora // *Phosphorus and Sulfur the Related Elements*. – 1976. – Vol. 2, № 1–3. – P. 1–50.
168. Lampela, O. Conformational Analysis of Glutathione in Aqueous Solution with Molecular Dynamics / O. Lampela, A. H. Juffer, A. Rauk // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2003. – Vol. 107, № 43. – P. 9208–9220.
169. Singh, G. Structure and vibrations of glutathione studied by vibrational spectroscopy and density functional theory / G. Singh, S. D. Dogra, S. Kaur,

- S. K. Tripathi, S. Prakash, B. Rai, G. S. S. Saini // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2015. – Vol. 149. – P. 505–515.
170. Vila-Viçosa, D. Conformational Study of GSH and GSSG Using Constant-pH Molecular Dynamics Simulations / D. Vila-Viçosa, V. H. Teixeira, H. A. F. Santos, M. Machuqueiro // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – Vol. 117, № 25. – P. 7507–7517.
171. Zhang, R. Different Behaviors of Glutathione in Aqueous and DMSO Solutions: Molecular Dynamics Simulation and NMR Experimental Study / R. Zhang, W. Wu, S. Luo // *Journal of Solution Chemistry*. – 2011. – Vol. 40, № 10. – P. 1784–1795.
172. Реутов, О. А. Органическая химия. В 4-х частях / О. А. Реутов, А. Л. Курц, К. П. Бутин. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 568 с.
173. Aldini, G. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why / G. Aldini, A. Altomare, G. Baron, G. Vistoli, M. Carini, L. Borsani, F. Sergio // *Free Radical Research*. – 2018. – Vol. 52, № 7. – P. 751–762. DOI:10.1080/10715762.2018.1468564
174. Fujiwara, S. Conformational Study of Glutathione by NMR / S. Fujiwara, G. Formicka-Kozłowska, H. Kozłowski // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1977. – Vol. 50, № 12. – P. 3131–3135. doi:10.1246/bcsj.50.3131.
175. Huckerby, T. N. Acid–base studies of glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine) by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy / T. N. Huckerby, A. J. Tudor, J. G. Dawber // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. – 1985. – №6. – P. 759–763.
176. Pitman, I. H. Covalent Additions of Glutathione, Cysteine, Homocysteine, Cysteamine and Thioglycolic Acid to Quinazoline Cation / I. H. Pitman, I. J. Morris // *Australian Journal of Chemistry*. – 1979. – Vol. 32, № 7. – P. 1567–1573.
177. Tang, S. S. Kinetic Characterization of the Endogenous Glutathione Transferase Activity of Octopus Lens S-Crystallin / S. S. Tang, G. G. Chang // *The Journal of Biochemistry*. – 1996. – Vol. 119, № 6. – P. 1182–1188.

178. Tajc, S. G. Direct Determination of Thiol pK_a by Isothermal Titration Microcalorimetry / S. G. Tajc, B. S. Tolbert, R. Basavappa, B. L. Miller // *Journal of The American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126, № 36. – P. 10508–10509.
179. Krekel, F. Determination of the pK_a Value of C115 in MurA (UDP-*N*-Acetylglucosamine Enolpyruvyltransferase) from *Enterobacter cloacae* / F. Krekel, A. K. Samland, P. Macheroux, N. Amrhein, J. N. S. Evans // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39, № 41. – P. 12671–12677.
180. Manceau, A. Thiols in Natural Organic Matter: Molecular Forms, Acidity, and Reactivity with Mercury(II) from First-Principles Calculations and High Energy-Resolution X-ray Absorption Near-Edge Structure Spectroscopy / A. Manceau, K. L. Nagy // *ACS Earth and Space Chemistry*. – 2019. – Vol. 3, № 12. – P. 2795–2807. doi.org/10.1021/acsearthspacechem.9b00278.
181. Wang, P. F. An unusually low pK_a for Cys282 in the active site of human muscle creatine kinase / P. F. Wang, M. J. McLeish, M. M. Kneen, G. Lee, G. L. Kenyon // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40, № 39. – P. 11698–11705.
182. Di Simplicio, P. Biochemical and biological aspects of protein thiolation in cells and plasma / P. Di Simplicio, S. Frosali, R. Priora, D. Summa, F. C. Di Simplicio, D. Di Giuseppe, A. Di Stefano // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2005. – Vol. 7, № 7–8. – P. 951–963.
183. Kortemme, T. Ionisation of Cysteine Residues at the Termini of Model α -Helical Peptides. Relevance to Unusual Thiol pK_a Values in Proteins of the Thioredoxin Family / Kortemme, T.; Creighton, T. E. // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – Vol. 253, № 5. – P. 799–812.
184. Yu, Q. Sulfhydryl binding sites within bacterial extracellular polymeric substances / Q. Yu, J. B. Fein // *Environmental Science & Technology*. – 2016. – Vol. 50, № 11. – P. 5498–5505.
185. Romero-Silva, A. Theoretical Study of the Reactivity and Selectivity of Various Free Radicals with Cysteine Residues / A. Romero-Silva, N. Mora-Diez, J. R. Alvarez-Idaboy // *ACS Omega*. – 2018. – Vol. 3, № 12. – P. 16519–16528. DOI: 10.1021/acsomega.8b02964.

186. Patlevič, P. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases / P. Patlevič, J. Vašková, P. Švorc Jr, L. Vaško, P. Švorc // Integrative Medicine Research. – 2016. – Vol. 5, № 4. – P. 250–258.
187. Chandra, J. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress / J. Chandra, A. Samali, S. Orrenius // Free Radical Biology & Medicine. – 2000. – Vol. 29, № 3–4. P. 323–333.
188. Bloodsworth, A. Nitric Oxide Regulation of Free Radical– and Enzyme-Mediated Lipid and Lipoprotein Oxidation / A. Bloodsworth, V. B. O'Donnell, B. A. Freeman // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2000. – Vol. 20, № 7. – P. 1707–1715.
189. Giniatullin, A. Action of Hydrogen Peroxide on Synaptic Transmission at the Mouse Neuromuscular Junction / A. Giniatullin, A. Petrov, R. Giniatullin // Neuroscience. – 2019. – Vol. 399. – P. 135–145.
190. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // Physiological reviews. – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
191. Linert, W. Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's Disease / W. Linert, G. N. L. Jameson // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2000. – Vol. 79, № 1–4. – P. 319–326. doi:10.1016/s0162-0134(99)00238-x
192. Sevanian, A. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences / A. Sevanian, F. Ursini // Free Radical Biology & Medicine. – 2000. – Vol. 29, № 3–4. – P. 306–311.
193. Arosio, P. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage / P. Arosio, S. Levi // Free Radical Biology & Medicine. – 2002. – Vol. 33, № 4. – P. 457–463.
194. Schnitzer, E. Peroxidation of liposomal lipids / E. Schnitzer, I. Pinchuk, D. Lichtenberg // European Biophysics Journal. – 2007. – Vol. 36. – P. 499–515.
195. Porter, N. A. A Perspective on Free Radical Autoxidation: The Physical Organic Chemistry of Polyunsaturated Fatty Acid and Sterol Peroxidation / N. A. Porter // The Journal of Organic Chemistry. – 2013. – Vol. 78, № 8. – P. 3511–3524.

196. Reuter, S. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? / S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 49, № 11. – P. 1603–1616.
197. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress / H. Sies // *Redox Biology*. – 2017. – Vol. 11. – P. 613–619. DOI.org/10.1016/j.redox.2016.12.035
198. Loffredo, L. COVID-19 and cardiovascular injury: A role for oxidative stress and antioxidant treatment? / L. Loffredo, F. Violi // *International Journal of Cardiology*. – 2020. – Vol. 312. – P. 136. doi:10.1016/j.ijcard.2020.04.066.
199. Chen, K. / Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction // K. Chen, S. R. Thomas, J. F. Keaney Jr. // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2003. – Vol. 35, № 2. – P. 117–132.
200. Battin, E. E. Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms / E. E. Battin, J. L. Brumaghim // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2009. – Vol. 55. – P. 1–23.
201. Kachur, A. V. Mechanism of Copper-Catalyzed Oxidation of Glutathione / A. V. Kachur, C. J. Koch, J. E. Biaglow // *Free Radical Research*. – 1998. – Vol. 28, № 3. – P. 259–269.
202. Buzuk, M. Real-time monitoring of “self-oxidation” of cysteine in presence of Cu^{2+} : novel findings in the oxidation mechanism / M. Buzuk, S. Brinić, N. Vladislavić, M. Bralić, M. Buljac, I. Š. Rončević // *Monatshefte Für Chemie – Chemical Monthly*. – 2015. – Vol. 147, № 2. – P. 359–367. doi:10.1007/s00706-015-1577-6.
203. Pecci, L. Novel findings on the copper catalysed oxidation of cysteine / L. Pecci, G. Montefoschi, G. Musci, D. Cavallini // *Amino Acids*. – 1997. – Vol. 13. – P. 355–367.
204. Hanaki, A. The Copper-catalyzed Autoxidation of Cysteine. The Amount of Hydrogen Peroxide Produced under Various Conditions and the Stoichiometry of the Reaction / A. Hanaki, H. Kamide // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1983. – Vol. 56, № 7. – P. 2065–2068. doi:10.1246/bcsj.56.2065.

205. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman // *The Journals of Gerontology*. – 1956. – Vol. 11, № 3. – P. 298–300. doi:10.1093/geronj/11.3.298.
206. Harman, D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009 / D. Harman // *Biogerontology*. – 2009. – Vol. 10, № 6. – P. 773–781. doi:10.1007/s10522-009-9234-2.
207. Chatgililoglu, C. The Kinetics of Thiyl Radical-Induced Reactions of Monounsaturated Fatty Acid Esters / C. Chatgililoglu, A. Altieri, H. Fischer // *Journal of The American Chemical Society*. – 2002. – Vol. 124, № 43. – P. 12816–12823.
208. Chatgililoglu, C. Trans lipids: the free radical path / C. Chatgililoglu, C. Ferreri // *Accounts of Chemical Research*. – 2005. – Vol. 38, № 6. – P. 441–448.
209. Mihaljevic, B. Linoleic acid peroxidation vs. isomerization: a biomimetic model of free radical reactivity in the presence of thiols / B. Mihaljevic, I. Tartaro, C. Ferreri, C. Chatgililoglu // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2011. – № 9. – P. 3541–3548.
210. Hunter, J. E. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review / J. E. Hunter, J. Zhang, M. Kris-Etherton // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2010. – Vol. 91, № 1. – P. 46–63.
211. Tardy, A. L. Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases / A. L. Tardy, B. Morio, J. M. Chardigny, C. Malpuech-Brugere // *Nutrition Research Reviews*. – 2011. – Vol. 24, № 1. – P. 111–117.
212. Gebauer, S. K. The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers / S. K. Gebauer, T. L. Psota, P. M. Kris-Etherton // *Lipids*. – 2007. – Vol. 42. – P. 787–799.
213. Bendsen, N. T. Effect of industrially produced *trans* fat on markers of systemic inflammation: evidence from a randomized trial in women / N. T. Bendsen, S. Stender, P. B. Szecsi, S. B. Pedersen, S. Basu, S. B. Hellgren, J. W. Newman, T. M. Larsen, S. B. Haugaard, A. Astrup // *Journal Lipid Research*. – 2011. – Vol. 52, № 10. – P. 1821–1828.

214. Niki, E. Regeneration of vitamin E from a-chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C / E. Niki, J. Tsuchiya, R. Tanimura, Y. Kamiya // *Chemistry Letters*. – 1982. – Vol. 11, № 6. – P. 789–792.
215. Posner, T. Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe / T. Posner // *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. – 1905. – Vol. 38, № 1. – P. 646–657. doi:10.1002/cber.190503801106.
216. Nilsson, C. Synthesis and thiol-ene photopolymerization of allyl-ether functionalized dendrimers / C. Nilsson, N. Simpson, M. Malkoch, M. Johansson, E. Malmström // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2008. – Vol. 46, № 4. – P. 1339–1348. doi:10.1002/pola.22474.
217. Hoyle, C. E. Thiol-Ene Click Chemistry / C. E. Hoyle, C. N. Bowman // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2010. – Vol. 49, № 9. – P. 1540–1573. doi:10.1002/anie.200903924.
218. Liu, Y. Thiol-ene click chemistry: a biocompatible way for orthogonal bioconjugation of colloidal nanoparticles / Y. Liu, W. Hou, H. Sun, C. Cui, L. Zhang, Y. Jiang, Y. Wu, Y. Wang, J. Li, B. S. Sumerlin, Q. Liu, W. Tan // *Chemical Science*. – 2017. – Vol. 8, № 9. – P. 6182–6187. DOI: 10.1039/c7sc01447c.
219. Biermann, U. Regioselectivity of Radical Addition of Thiols to 1-Alkenes / U. Biermann, J. O. Metzger // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – Vol. 2018, № 6. – P. 730–734. DOI: 10.1002/ejoc.201701692.
220. Koo, S. P. S. Limitations of radical thiol-ene reactions for polymer-polymer conjugation / S. P. S. Koo, M. M. Stamenovic', R. A. Prasath, A. J. Inglis, F. E. Du Prez, C. Barner-Kowollik, W. V. Camp, T. Junker // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2010. – Vol. 48, № 8. – P. 1699–1713.
221. Vanslambrouck, S. Thiol-ene Reaction: An Efficient Tool to Design Lipophilic Polyphosphoesters for Drug Delivery Systems / S. Vanslambrouck, R. Riva, B. Ucar, V. Pr at, M. Gagliardi, D. G. B. Molin, H. Lecomte, C. Jérôme // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 6. – P. 1–14. doi.org/10.3390/molecules26061750.

222. Thénard, L. J. Observations sur les combinaisons nouvelle entre l'oxygen et divers acides / L. J. Thénard // *Annales de chimie et de physique*. – 1818. – Vol. 8. – P. 306–312.
223. Flohé, L. Looking Back at the Early Stages of Redox Biology / L. Flohé // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, № 12. – P. 1254. <https://doi.org/10.3390/antiox9121254>.
224. Schönbein, C. F. Ueber die katalytische Wirksamkeit organischer Materien und deren Verbreitung in der Pflanzen-und Thierwelt / C. F. Schönbein // *Journal für Praktische Chemie*. – 1863. – Vol. 98. – P. 323–344.
225. Белякова, Ю. Ю. Синтез озонидов из 1,5-дикетонов и пероксида водорода / Ю. Ю. Белякова, А. Е. Виликотский, П. С. Радулов, И. А. Ярёмченко, А. О. Терентьев // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2017. – Т. 31, № 12. – С. 6–8.
226. Sies, H. Role of Metabolic H₂O₂ Generation: REDOX SIGNALING AND OXIDATIVE STRESS / H. Sies // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, № 13. – P 8735–8741. DOI 10.1074/jbc.R113.544635.
227. Varma, S. D. Hydrogen Peroxide in Human Blood / S. D. Varma, P. S. Devamanoharan // *Free Radical Research Communications*. – 1991. – Vol. 14, № 2. – P. 125–131.
228. Nahum, A. Measurement of hydrogen peroxide in plasma and blood / A. Nahum, L. D. H. Wood, J. I. Sznajder // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1989. – Vol. 6, № 5. – P. 479–484.
229. Forman, H. J. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? / H. J. Forman, A. Bernardo, K. J. A. Davies // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – Vol. 603. – P. 48–53. doi:10.1016/j.abb.2016.05.005.
230. Griendling, K. K. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease / K. K. Griendling, D. Sorescu, M. Ushio-Fukai // *Circulation Research*. – 2000. – Vol. 86, № 5. – P. 494–501.
231. Bonekamp, N. A. Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance / N. A. Bonekamp, A. Volkl, H. D. Fahimi, M. Schrader // *Biofactors*. – 2009. – Vol. 35, № 4. – P. 346–355.

232. del Rio L. A. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling / L. A. del Rio, L. M. Sandalio, F. J. Corpas, J. M. Palma, J. B. Barroso // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141, № 2. – 330–335.
233. Schrader, M. Peroxisomes and oxidative stress / M. Schrader, H. D. Fahimi // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. – 2006. – Vol. 1763, № 12. – P. 1755–1766.
234. Deutsch, J. C. Glutathione oxidation in real time by thermospray liquid chromatography–mass spectrometry / J. C. Deutsch, C. R. Santhosh-Kumar, J. F. Kolhouse // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – Vol. 862, № 2. – P. 161–168.
235. Petzold, H. Oxidation induced by the antioxidant glutathione / H. Petzold, P. J. Sadler // *Chemical Communications*. – 2008. – № 37. – P. 4369–4508. DOI:10.1039/b805358h.
236. Abedinzadeh, Z. On N-acetylcysteine. Part II. Oxidation of N-acetylcysteine by hydrogen peroxide: kinetic study of the overall process / Z. Abedinzadeh, J. Arroub, M. Gardès-Albert // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1994. – Vol. 72, № 10. – P. 2102–2107.
237. Chin, F. Y.-C. The peroxide-coupling kinetics and dissociation constants of aqueous cysteine and glutathione: experimental and model results, and implications / F. Y.-C. Chin, P. K. Lim // *Chemical Engineering Science*. – 1989. – Vol. 44, № 4. – P. 883–893. doi:10.1016/0009-2509(89)85261-3
238. Barton, J. P. Kinetics of the reaction of hydrogen peroxide with cysteine and cysteamine / J. P. Barton, J. E. Packer, R. J. Sims // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. – 1973. – № 11. – P. 1547–1549.
239. Veal, E. Hydrogen Peroxide as a Signaling Molecule / E. Veal, A. Day // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – Vol. 15, № 1. – P. 147–151.
240. Radi, R. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls / R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 266, № 7. – P. 4244–4250.

241. Leung, P.-S. K. Kinetics and mechanism of the oxidation of 2-mercaptoethanol by hydrogen peroxide in aqueous solution / P.-S. K. Leung, M. R. Hoffmann // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1985. – Vol. 89, № 24. –P. 5267–5271.
242. Wang, S. S.-S. Kinetic studies of the oxidation of glutathione in protein refolding buffer / S. S.-S. Wang, Y.-T. Hung, Y.-C. Lin // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2009. – Vol. 33, № 2. – P. 277–286. doi:10.1007/s00449-009-0322-0.
243. Deutsch, J. C. Glutathione oxidation in real time by thermospray liquid chromatography–mass spectrometry / J. C. Deutsch, C. R. Santhosh-Kumar, J. F. Kolhouse // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – Vol. 862, № 2. – P. 161–168.
244. Picquart, M. Spectroscopic study of N-acetylcysteine and N-acetylcystine/hydrogen peroxide complexation / M. Picquart, Z. Abedinzadeh, L. Grajcar, M. H. Baron // *Chemical Physics*. – 1998. – Vol. 228, № 1–3. – P. 279–291. doi:10.1016/s0301-0104(97)00337-6.
245. Lauwers, K. Water electrolyte promoted oxidation of functional thiol groups / K. Lauwers, E. Breynaert. I. Rombouts. J. A. Delcour, C. E. A. Kirschhock // *Food Chemistry Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 197, Part B. – P. 1235–1239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.075>.
246. Pillay, C. S. Can thiol-based redox systems be utilized as parts for synthetic biology applications? / C. S. Pillay, N. John // *Redox Report*. – 2021. – Vol. 26, № 1. – P. 147–159. DOI: 10.1080/13510002.2021.1966183
247. Roginsky, V. A. Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles / V. A. Roginsky // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2003. – Vol. 414, № 2. – P. 261–270.
248. Van Hook, J.P. The Thermal decomposition of 2,2'- azo-bis-izobutyronitrile / J. P. Van Hook, A. V. Tobolsky // *Journal of The American Chemical Society*. – 1958. – Vol. 80, № 4. – P. 779–782.
249. Konya, K. G. Laser flash photolysis studies on the first superoxide thermal source. First direct measurements of the rates of solvent-assisted 1,2-hydrogen atom shifts and a proposed new mechanism for this unusual rearrangement / K. G. Konya, T. Paul, S. Lin,

- J. Luszyk, K. U. Ingold // *Journal of The American Chemical Society*. – 2000. – Vol. 122, № 31. – P. 7518–7527.
250. Ingold, K. U. Invention of the first azo compound to serve as a superoxide thermal source under physiological conditions: Concept, synthesis, and chemical properties / K. U. Ingold, T. Paul, M. J. Young, L. Doiron // *Journal of The American Chemical Society*. – 1997. – Vol. 119, № 50. – P. 12364–12366.
251. Касаикина, О.Т. Влияние поверхностно-активных веществ на жидкофазное окисление углеводов и липидов / О. Т. Касаикина, З. С. Карташева, Л. М. Писаренко // *Журнал Общей Химии*. – 2008. – № 8. – С. 1298–1309.
252. Касаикина, О. Т. Катализ радикальных реакций в смешанных мицеллах поверхностно-активных веществ с гидропероксидами / О. Т. Касаикина, Н. В. Потапова, Д. А. Круговов, Л. М. Писаренко // *Кинетика и Катализ*. – 2017. – Т. 58, № 5. – С. 567–573.
253. Ozhogina, O. A. β -Carotene as an interceptor of free radicals / O. A. Ozhogina, O. T. Kasaikina // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1995. – Vol. 19, №5. – P. 575–581.
254. Зинатуллина, К.М. Взаимодействие полиметиновых красителей с гидропероксидами / К. М. Зинатуллина, О. Т. Касаикина, В. А. Кузьмин, Н. П. Храмеева, Б. И. Шапиро // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – №12. – 2016. – С. 2825–2831.
255. Денисова, Т. Г. Рекомбинация 1,1-диметилпропил-пероксирадикалов в полярных растворителях / Т. Г. Денисова, В. Ф. Шувалов // *Кинетика и катализ*. – 2016. – Т. 57, № 1. – С. 22–25.
256. Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups / G. L. Ellman // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1959. – Vol. 82. – P. 70–77.
257. Riener, C. K. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine / C. K. Riener, G. Kada, H. J. Gruber // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2002. – Vol. 373. – P. 266–276. DOI: 10.1007/s00216-002-1347-2.

258. Riddles, P. W. Reassessment of Ellman's Reagent / P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner // *Methods in Enzymology*. – 1983. – Vol. 91. – P. 49–60.
259. Collier, H. B. A Note on the Molar Absorptivity of Reduced Ellman's Reagent, 3-Carboxylato-4-Nitrothiophenolate / H. B. Collier // *Analytical Biochemistry*. 1973. – Vol. 56, № 1. – P. 310–311.
260. Fischer, H. *Landolt-Börnstein: Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology. New Series* / Ed. H. Fischer. – Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo : Springer-Verlag, 1983, Vol. 13. – 308 p.
261. Зинатуллина, К. М. Кинетические характеристики взаимодействия природных тиолов с пероксильными радикалами и пероксидом водорода / К. М. Зинатуллина, О. Т. Касаикина, В. А. Кузьмин, Н. П. Храмеева, Б. И. Шапиро. // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2017. – № 7. – С. 1300–1303.
262. Langcake, P. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury / P. Langcake, R. J. Pryce // *Physiology and Plant Pathology*. – 1976. – Vol. 9, № 1. – P. 77–86.
263. Frémont, L. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids / L. Frémont, L. Belguendouz, S. Delpal // *Life Sciences*. – 1999. – Vol. 64, № 26. – P. 2511–2521.
264. Renaud, S. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease / S. Renaud, M. de Lorgeril // *The Lancet*. – 1992. – Vol. 339, № 8808. – P. 1523–1526.
265. Jang, M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes / M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. E. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, J. M. Pezzuto // *Science*. – 1997. – Vol. 275, № 5297. – P. 218–220.
266. Salehi, B. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits / B. Salehi, A. P. Mishra, M. Nigam, B. Sener, M. Kilic, M. Sharifi-Rad, P. V. T. Fokou, N. Martins, J. Sharifi-Rad // *Biomedicines*. – 2018. – Vol. 6, № 3. 10.3390/biomedicines6030091.

267. Yu W., Fu Y.C., Wang W. / Cellular and Molecular Effects of Resveratrol in Health and Disease / W. Yu, Y. C. Fu, W. Wang // Journal of Cellular Biochemistry. – 2012. – Vol. 113, № 3. – P. 752–759. <https://doi.org/10.1002/jcb.23431>
268. Kovacic, P. Multifaceted Approach to Resveratrol Bioactivity: Focus on Antioxidant Action, Cell Signaling and Safety / P. Kovacic, R. Somanathan // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 86–100. doi:10.4161/oxim.3.2.11147.
269. Зинатуллина, К. М. Кинетические характеристики взаимодействия ресвератрола с пероксильными радикалами и природными тиолами в водной среде / К. М. Зинатуллина, Н. П. Храмеева, О. Т. Касаикина, Б. И. Шапиро, В. А. Кузьмин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2017. – № 11. – С. 2145–2151.
270. Amorati, R. Antioxidant Activity of Hydroxystilbene Derivatives in Homogeneous Solution / R. Amorati, M. Lucarini, V. Mugnaini, G. F. Pedulli // The Journal of Organic Chemistry. – 2004. – Vol. 69, № 21. – P. 7101-7107. <https://doi.org/10.1021/jo0497860>.
271. Гадомская, А. В. Цепной механизм реакции N,N'-дифенил-1,4-бензохинондиимина с 2-меркаптобензотиазолом / А. В. Гадомская, В. Т. Варламов // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 439, № 6. – С. 767–769.
272. Гадомская, А. В. Цепной механизм реакций N,N'-дифенил-1,4-бензохинондиимина с тиофенолом и n-децилтиолом / А. В. Гадомская, С. Я. Гадомский, В. Т. Варламов // Кинетика и катализ. – 2012. – Т. 53, № 5. – С. 550–555.
273. Менгеле, Е. А. Влияние меркаптоэтанола на окисление углеводов и *цис-транс* изомеризацию ненасыщенных липидов / Е. А. Менгеле, Д. А. Круговов, О. Т. Касаикина // Известия Академии наук. Серия Химическая. – 2015. – № 4. – P. 846–851.
274. Зинатуллина, К. М. Взаимодействие глутатиона с пероксидом водорода. Кинетическая модель / К. М. Зинатуллина, О. Т. Касаикина, В. А. Кузьмин, Н. П. Храмеева // Кинетика и Катализ. – 2019. – Том 60, № 3. – С. 281–288.
275. Зинатуллина, К. М. Особенности взаимодействия глутатиона с активными формами кислорода в фосфатно-буферных растворах / К. М. Зинатуллина,

- О. Т. Касаикина, В. А. Кузьмин, Н. П. Храмеева, Л. М. Писаренко // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019. – №7. – С.1441–1444.
276. Kovarski, A. L. Spin probes and Labels. A Quarter of a Century of Application to Polymer Studies / A. L. Kovarski // Polymer Yearbook. 1996. – Vol. 13. – P. 113–139.
277. Xu, Y. An Advanced Electron Spin Resonance (ESR) Spin-Trapping and LC/(ESR)/MS Technique for the Study of Lipid Peroxidation / Y. Xu, Y. Gu, S. Y. Qian // International Journal of Molecular Sciences. – 2012. – Vol. 13, № 11. – P. 14648–14666. doi:10.3390/ijms131114648.
278. Davies, M. J. Electron spin resonance and pulse radiolysis studies on the spin trapping of sulphur-centered radicals / M. J. Davies, L. G. Forni, S. L. Shuter // Chemico-Biological Interactions. – 1987. – Vol. 61, № 2. – P. 177–188.
279. Maki, T. Flow injection fluorometric determination of ascorbic acid using perylenebisimide-linked nitroxide / T. Maki, N. Soh, K. Nakano, T. Imato // Talanta. – 2011. – Vol. 85, № 4. – P. 1730–1733.
280. Matsuoka, Y. Rapid and convenient detection of ascorbic acid using a fluorescent nitroxide switch / Y. Matsuoka, M. Yamato, T. Yamasaki, F. Mito, K. Yamada // Free Radical Biology and Medicine. – 2012. – Vol. 53, № 11. – P. 2112–2118. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.032.
281. Nam, H. Highly Sensitive and Selective Fluorescent Probe for Ascorbic Acid with a Broad Detection Range through Dual-Quenching and Bimodal Action of Nitronyl-Nitroxide / H. Nam, J. E. Kwon, M. W. Choi, J. Seo, S. Shin, S. Kim, S. Y. Park // ACS Sensors. – 2016. – Vol. 1, № 4. – P. 392–398. doi.org/10.1021/acssensors.5b00230.
282. Pietraforte, D. Role of thiols in the targeting of S-nitroso thiols to red blood cells / D. Pietraforte, C. Mallozzi, G. Scorza, M. Minetti // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34, № 21. – P. 7177–7185.
283. Зинатуллина, К. М. Особенности образования радикалов в реакциях тиолов с пероксидом водорода / К. М. Зинатуллина, О. Т. Касаикина, М. В. Мотякин, И. С. Ионова, Е. Н. Дегтярев, Н. П. Храмеева // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2020. – № 10. – С. 1865–1868.

284. Менгеле, Е. А. Влияние кислорода и антиоксидантов на цис-/транс-изомеризацию ненасыщенных жирных кислот, обусловленную тиольными радикалами / Е. А. Менгеле, К. Феррери, К. Чатжилиалоглу, О. Т. Касаикина // Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия. 2010. – Т.51, № 3. – С. 243–245.
285. Зинатуллина, К. М. Про- и антиокислительные характеристики природных тиолов / К. М. Зинатуллина, Н. П. Храмеева, О. Т. Касаикина, В. А. Кузьмин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2018 – № 4. – С. 726–730.
286. Zinatullina, K. M. Interaction of natural thiols and catecholamines with reactive oxygen species / K. M. Zinatullina, N. P. Khrameeva, O. T. Kasaikina // Bulgarian Chemical Communications. – 2018. – Vol. 50, Special Issue C. – P. 25–29.
287. А. В. Соколов, С. В. Попов, Е. М. Плисс, Д. В. Лошадкин. «Кинетика 2012 – программа для расчета кинетических параметров химических и биохимических процессов». Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности «Программы для ЭВМ. Базы данных. Топологии интегральных микросхем», № 3, опубли. 20.03.2013.
288. Воробьев, А. Х. Практическая химическая кинетика. Химическая кинетика в задачах с решениями: Учебное пособие / А. Х. Воробьев, В. И. Иванов, Л. Е. Китаев, А. А. Кубасов, М. Я. Мельников, Б. И. Ужинов, С. Я. Уманский, Н. В. Фок, Б. Р. Шуб; под общ. ред. М. Я. Мельникова – М. : Изд-во МГУ; СПб. : Изд-во СПбГУ, 2006. – 592 с.
289. Зинатуллина, К. М. Взаимодействие глутатиона с ресвератролом в присутствии пероксида водорода. Кинетическая модель / К. М. Зинатуллина, О. Т. Касаикина, Н. П. Храмеева, М. И. Индейкина, А. С. Кононихин // Кинетика и Катализ. – 2021. – Том 62, №2. – С. 198–207.
290. Ito, O. Evaluation of Addition Rates of p-Chlorobenzenethiyl Radical to Vinyl Monomers by Means of Flash Photolysis / O. Ito, M. Matsudo // Journal of the American Chemical Society. – 1979. – Vol. 101, № 7. – P. 1815–1819.
291. Ito, O. Evaluation of Addition Rates of the Thiyl Radicals to Vinyl Monomers by Flash Photolysis. 2. Substituent Effect on Addition of Substituted Benzenethiyl Radicals

to Methyl Methacrylate or Styrene / O. Ito, M. Matsudo // *Journal of the American Chemical Society*. – 1979. – V. 101, № 19. – P. 5732–5735.

292. Зинатуллина, К. М. Ацетилцистеин – эффективный аналог глутатиона в реакциях с активными формами кислорода / К. М. Зинатуллина, А. В. Орехова, О. Т. Касаикина, Н. П. Храмеева, М. П. Березин, И. Ф. Русина // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2021. – № 10. – С. 1934–1938.

293. Frei, B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma / B. Frei, R. Stocker, B. N. Ames // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – Vol. 85, № 24. – P. 9748–9752. doi: 10.1073/pnas.85.24.9748.

294. Dougherty, D. A. Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition / D. A. Dougherty, D. A. Stauffer // *Science*. – 1990. – Vol. 250, № 4987. – P. 1558–1560.

295. Dougherty, D. A. The Cation- π Interaction / D. A. Dougherty // *Accounts of Chemical Research*. – 2013. – Vol. 46, № 4. – P. 885–893.

296. Ma, J. C. The Cation- π Interaction / J. C. Ma, D. A. Dougherty // *Chemical Reviews*. – 1997. – Vol. 97, № 5. – P. 1303–1324.

297. Van Arnam, E. B. Functional Probes of Drug–Receptor Interactions Implicated by Structural Studies: Cys-Loop Receptors Provide a Fertile Testing Ground / E. B. Van Arnam, D. A. Dougherty // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 57, № 15. – P. 6289–6300. doi.org/10.1021/jm500023m.

298. Davis, M. R. Cation- π interactions: computational analyses of the aromatic box motif and the fluorination strategy for experimental evaluation / M. R. Davis, D. A. Dougherty // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – Vol. 17, № 43. – P. 29262–29270. doi.org/10.1039/C5CP04668H.

299. Lesslie, M. Hydrogen atom transfer in metal ion complexes of the glutathione thiyl radical / M. Lesslie, J. K.-C. Laub, G. Pacheco, J. T. Lawler, K. W. M. Siub, A. C. Hopkinson, V. Ryzhova // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 2018. – Vol. 429. – P. 39–46. doi.org/10.1016/j.ijms.2017.04.012.

300. Francis, P.T. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress / P.T. Francis, A. M. Palmer, M. Snape, G. K. Wilcock // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 1999. – Vol. 66, № 2. – P.137–147.
301. Baig, A.M. Traced on the Timeline: Discovery of Acetylcholine and the Components of the Human Cholinergic System in a Primitive Unicellular Eukaryote *Acanthamoeba* spp / A. M. Baig, Z. Rana, S. Tariq, S. Lalani, H. R. Ahmad // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2018. – Vol. 9, № 3. – P. 494–504. doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00254.
302. Потапова, Н. В. Каталитическое генерирование радикалов в супрамолекулярных системах с участием ацетилхолина / Н. В. Потапова, О. Т. Касаикина, М. П. Березин, И. Г. Плащина // *Кинетика и катализ*. – 2020. – Т. 61, № 5. – С. 700–707.
303. Korolev, N. How potassium came to be the dominant biological cation: of metabolism, chemiosmosis and cation selectivity since the beginnings of life / N. Korolev // *Bioessays*. – 2020. – Vol. 43, № 1. – Article 2000108. <https://doi.org/10.1002/bies.20200010>
304. Kancheva, V. D. Phenolic antioxidants of natural origin – structure activity relationship and their beneficial effect on human health / V. D. Kancheva // *Phytochemicals and Human Health: Pharmacological and Molecular Aspects*. – 2012. – Chapter I. – P. 1–45.
305. Kancheva, V. D. Structure-activity relationship of dihydroxy-4methyl-coumarins as powerful antioxidants. Correlation between experimental & theoretical data and synergistic effect / V. D. Kancheva, L. Saso, P. V. Boranova, A. Khan, M. Saron, V. S. Parmar // *Biochemie*. – 2010. – Vol. 92, № 9. – P. 1089–1100.
306. Kancheva, V. D. Antiradical and antioxidant activities of new bioantioxidants / V. D. Kancheva, L. Saso, S. A. Angelova, M. C. Foti, A. Slavova-Kazakova, C. Draquino, V. Enchev, O. Firuzi, J. Nechev // *Biochemie*. – 2012. – Vol. 94, № 2. – P. 403–415.
307. Kasaikina, O. T. Effect of Lipophilic and Hydrophilic Thiols on the Lipid Oxidation / O. T. Kasaikina, K. M. Zinatullina, V. D. Kancheva, A. Slavova-Kasakova,

D. Loshadkin // Lipid Oxidation in Food and Biological Systems. – 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-87222-9

308. Loshadkin, D. V. Features of Methyl Linoleate Oxidation in Triton X-100 Micellar Buffer Solutions / D. V. Loshadkin, E. M. Pliss, O. T. Kasaikina // JOURNAL OF APPLIED CHEMISTRY. – 2020. – Vol. 93, № 7. – P. 1090–1095. DOI: 10.1134/S1070427220070216.

309. Зинатуллина, К. М. Особенности взаимодействия природных тиолов с активными формами кислорода (АФК) в фосфатных буферных растворах / К. М. Зинатуллина, О. Т. Касаикина, В. А. Кузьмин, Н. П. Храмева, Д. В. Лошадкин, С. В. Молодочкина // Сборник трудов ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук. Секция «Динамика химических и биологических процессов». – 2019. – С. 28–37.