

На правах рукописи



Зинатуллина Карина Марсовна

**КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ
ГИДРОФИЛЬНЫХ ТИОЛОВ**

1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре химической физики им. Н. Н. Семёнова Российской академии наук и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель:

Касаикина Ольга Тарасовна
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Терентьев Александр Олегович
член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией исследования гомолитических реакций ИОХ РАН, зам. директора ИОХ РАН

Мельников Михаил Яковлевич
доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химической кинетики Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук

Защита диссертации состоится « » _____ 2022 г. в ____ часов ____ минут на заседании диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н. Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на сайте: https://biochemphysics.ru/assets/upload/docs2021/Dissertacia_Zinatullina.pdf

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
24.1.038.01, кандидат химических наук



Л. И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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. 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 миллимолярной 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 в работах В. Т. Варламова (ИПХФ РАН) 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. 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 pH 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 (Hopkins F. G., 1921, Biochem. J.) 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 pH 7,2–7,4, долгое время предполагалось, что реакции тиолов с АФК протекают гетеролитически или по механизму нуклеофильного замещения (Winterbourn C. C. et al., 1978–2017 гг.). С другой стороны, многие авторы утверждают, что тиолы активно реагируют с радикалами с образованием в обменных реакциях тиольных радикалов (Niki E. et al. 2012, Biofactor), которые регистрировали методом спиновых ловушек, например, (Stoyanovsky, D. A. et al. 2011, Anal. Chem.). В работах разных авторов отмечается, что значения константы скорости

реакции тиолов с супероксид анионом $O_2^{\bullet -}$ варьируются на четыре порядка величины $\sim 10-10^5$ $(M \times c)^{-1}$.

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 (Abedinzadeh Z., et al. 1989, Can. J. Chem.; 1993, Theor. Chim. Acta; 2001, Can. J. Physiol. Pharm.; 2005, J. Pharm. Sci.). 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 pH, но и в чистой воде, когда образуется кислая реакционная смесь с pH 2. Так же, как в работах Winterbourn C. C. и Niki E., они установили, что в целом реакция тиолов (глутатиона, цистеина, *N*-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, гидротиилирование 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 (Turunc O., Meier M.A.R. 2012, Europ. J. Lipid Sci. Techn.). 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 рН 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, *N*-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 рН 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-спектроскопии, 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 «abcrGmbH», 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 ресвератрола с пероксильными радикалами 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении обоснована актуальность темы исследования; сформулированы цель и задачи исследования; описана ее теоретическая и практическая значимость; представлены положения, выносимые на защиту; дана оценка научной новизны полученных результатов и личного вклада автора.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Приведены основные сведения о теории жидкофазного окисления липидов, механизмах действия антиоксидантов разных типов. Изложены сведения о содержании тиолов в живых организмах и их физиологическом действии, взаимосвязи с различными заболеваниями; кратко рассмотрено применение тиолов в качестве БАДов и лекарственных средств. Представлены основные данные о физико-химических свойствах природных тиолов, кинетике и механизме реакций природных тиолов с активными формами кислорода.

В Главе 2 представлены материалы и методы, использованные при проведении исследований, описаны методики проведения экспериментов и методы анализа.

Объектами исследования служили биоантиоксиданты: водорастворимые тиолы (глутатион, гомоцистеин, цистеин, *N*-ацетилцистеин) и природные фенолы, содержащие ненасыщенную связь в боковой цепи (ресвератрол и кофейная кислота) (Рисунок 1).

Реакции биоантиоксидантов с пероксильными радикалами и с H_2O_2 проводили, как правило, при $37 \pm 0,5$ °C в бидистиллированной и деионизированной воде (Direct-Q UV Millipore, 18 МОм × см), фосфатных буферах (PBS, натрий-калиевый фосфатный буфер, натриевый- и калиевый-фосфатные буферы), которые готовили с использованием деионизированной воды. pH растворов измеряли pH-метром-милливольтметром pH-410 «Аквилон». Ошибка в измерении pH составляла $\pm 0,02$. Изменение концентрации тиолов в ходе реакции контролировали по методу Элмана. В качестве источника пероксильных радикалов использовали водорастворимый азоинициатор AAPH (2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан) дигидрохлорид).

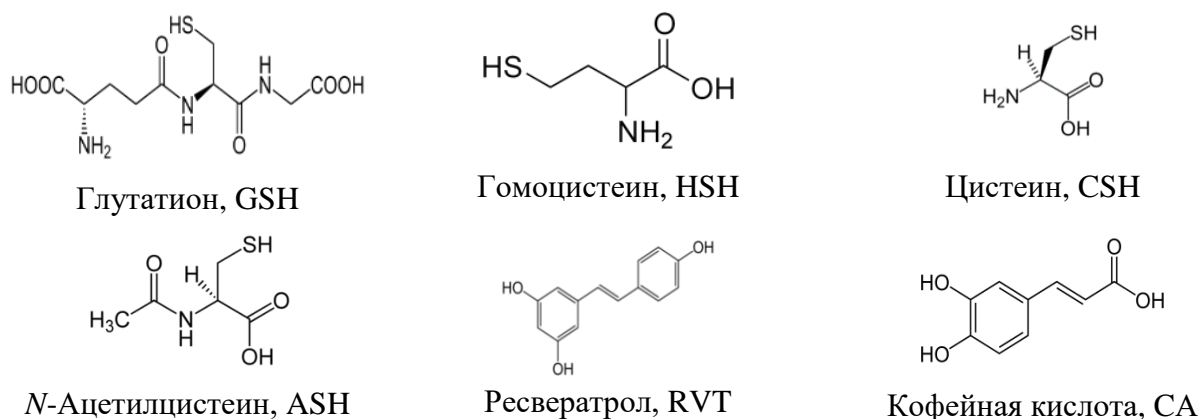


Рисунок 1. Структурные формулы тиолов и природных фенолов.

Подробно описан выбор в качестве акцептора радикалов анионного полиметинового красителя **A** (пиридиновая соль 3,3'-ди- γ -сульфопропил-9-метилтиакарбо-цианинбетаина), концентрацию которого регистрировали спектрофотометрически (в водных растворах $\varepsilon = 0,77 \times 10^5 \text{ (M} \times \text{cm)}^{-1}$ при $\lambda_{\text{max}} = 546 \text{ nm}$). Этот краситель инертен по отношению к тиолам и пероксидам, а с пероксильными радикалами, образующимися в воде при распаде ААРН, реагирует с константой скорости, равной $5,4 \times 10^4 \text{ (M} \times \text{s)}^{-1}$, и стехиометрическим коэффициентом $f = 1$ в воде и $f = 2$ в PBS при pH 7,4.

Представлены методы исследования: 1. Кинетическая спектрофотометрия для анализа скоростей расходования акцептора радикалов и фенолов с использованием Ultraspec 1100 Pro («Amershamplc», США) и «СФ-2000» (ООО «ОКБ Спектр», Россия). 2. Метод ЭПР с использованием спиновой ловушки DMPO (5,5-Диметилпирролин-N-оксид) на спектрометре Bruker EMX (Германия) для определения природы радикалов, образующихся при взаимодействии тиолов с H_2O_2 . 3. Масс-спектрометрия с электроспрейной ионизацией в режиме измерения положительных ионов для анализа молекулярных продуктов реакций на tandemном масс-спектрометре LTQ FT Ultra (ThermoFinnigan, Бремен, Германия). 4. Изотермическая калориметрия на приборе ДАК-1-1 (ООО ТД «Аналитические приборы», Россия) для анализа кинетики тепловыделения в реакциях тиолов GSH и ASH с H_2O_2 . 5. Кинетическое компьютерное моделирование с использованием программы для ЭВМ «Кинетика 2012 – программа для расчета кинетических параметров химических и биохимических процессов» для разработки кинетических моделей взаимодействия GSH с H_2O_2 и тиол-ен реакции GSH с RVT.

В Главах 3–5 представлены результаты исследований и их обсуждение.

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

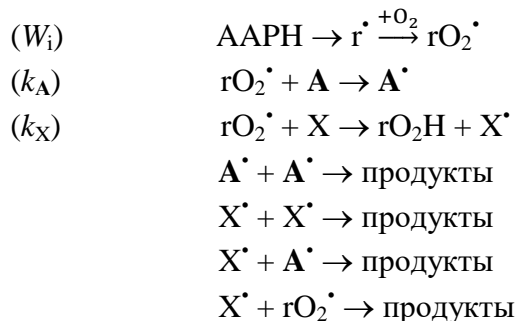
Оценку антирадикальной активности тиолов и ресвератрола проводили методом конкурирующих реакций с акцептором **A**.

На Рисунке 2 показано, что при постоянной скорости инициирования радикалов добавки глутатиона уменьшают скорость его расходования (кр. 2–4) и действуют как конкурирующий акцептор радикалов. Из анализа кинетической схемы расходования двух конкурирующих акцепторов радикалов **A** и тиолов или фенолов (**X**), реагирующих с пероксильными радикалами, образующимися при распаде инициатора ААРН (Схема 1), следует уравнение (1), которое описывает зависимость скорости расходования красителя **A** от скорости инициирования и концентрации реагентов (**A**, **X**).

На Рисунке 3 показано, что уменьшение скорости расходования **A** в присутствии тиолов и ресвератрола согласуется с уравнением (1). Из наклона линейных зависимостей, представленных

на Рисунке 3 ($tg\varphi = (k_X / k_A) / W_i$), рассчитаны константы скорости реакций с пероксильными радикалами $k_X = tg\varphi \times k_A \times W_i$, которые характеризуют тиолы, как ингибиторы умеренной силы. Наиболее высокую активность в ряду тиолов проявляет цистеин (Таблица 1).

Схема 1



$$\frac{1}{W_A} = \frac{1 + \frac{k_X}{k_A} \times \frac{[X]}{[A]}}{W_i}, \quad (1)$$

$$W_{RVT} / W_A = (k_{RVT} [RVT]) / (k_A [A]), \quad (2)$$

$$f = W_i / W_X, \text{ где } (X = RVT, \text{ тиолы}). \quad (3)$$

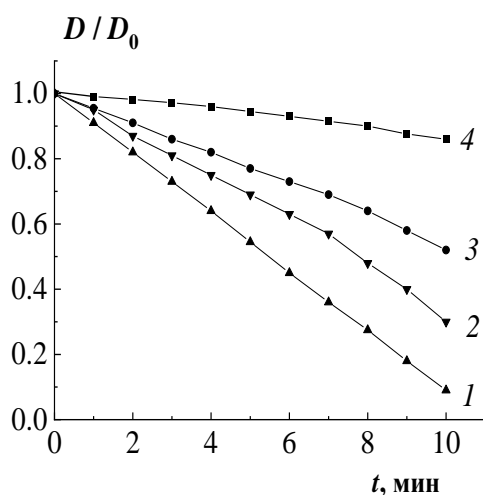


Рисунок 2. Влияние добавок глутатиона на скорость расходования 10 μM акцептора **A**, инициированного 15 mM AAPH; 37 $^\circ\text{C}$; [GSH], μM : 1 – 0; 2 – 4; 3 – 10; 4 – 40.

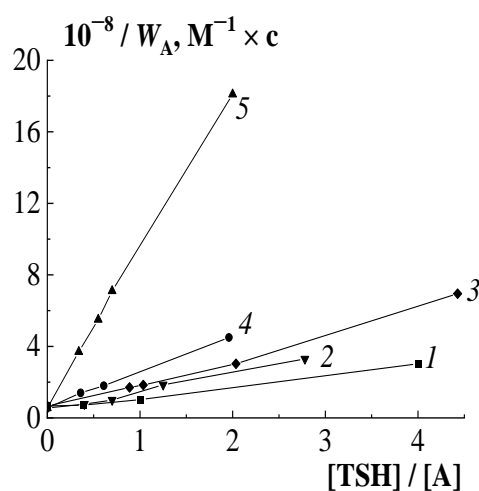


Рисунок 3. Зависимость скорости расходования акцептора **A** (W_A) от концентрации тиолов и ресвератрола: GSH (1), ASH (2), RVT (3) HSH (4) и CSH (5) в координатах уравнения (1); [AAPH] = 15 mM .

Спектры поглощения ресвератрола (RVT) и акцептора **A** практически не перекрываются, поэтому при близких концентрациях RVT и **A** в присутствии AAPH наблюдается расходование обоих компонентов (Рисунок 4). Из анализа схемы 1 следует, что отношение скоростей расходования ресвератрола и **A** пропорционально отношению их концентраций (уравнение (2)). Примечательно, что значения констант скорости взаимодействия ресвератрола с $rO_2\dot{O}$, определенные по уравнениям (1) и (2) практически совпадают ($1,1 \times 10^5$ и $1,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$, Рисунки 3 и 5, соответственно).

В Таблице 1 представлены оценки k_X и f для изученных соединений по отношению к радикалам, образующимся при распаде AAPH в воде. По величине k_X тиолы и ресвератрол можно отнести к ингибиторам средней силы.

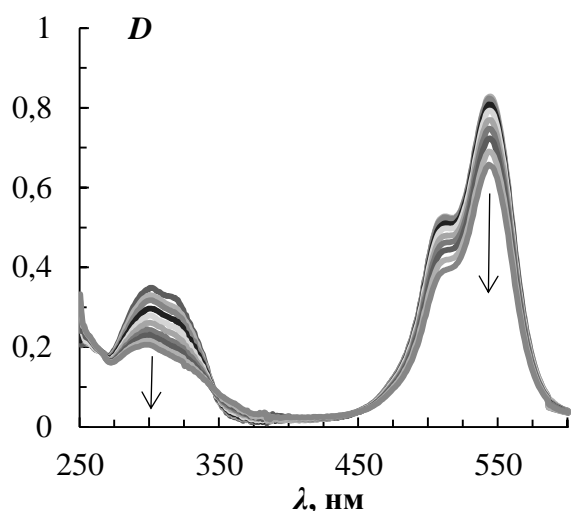


Рисунок 4. Изменение спектров поглощения раствора, содержащего 11 μM акцептора А, 11 μM ресвератрола и 18 мМ ААРН во времени при 37 $^{\circ}\text{C}$; спектры записаны через 1 мин.

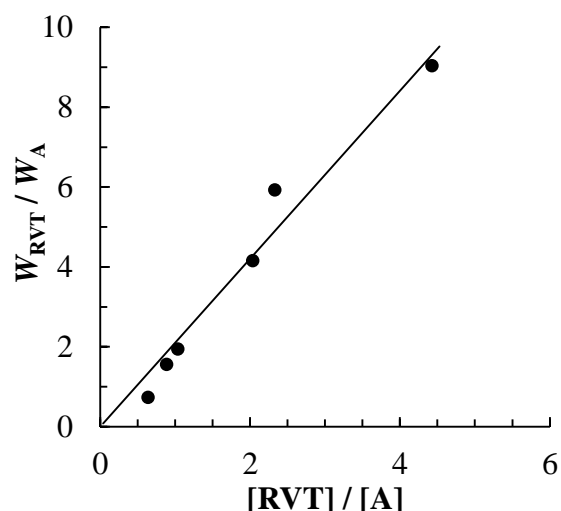


Рисунок 5. Зависимость отношения скоростей расходования RVT и акцептора А ($W_{\text{RVT}} / W_{\text{A}}$) от отношения их концентраций в координатах уравнения (2).

Таблица 1. Кинетические характеристики антирадикальной активности тиолов и ресвератрола в воде при 37 $^{\circ}\text{C}$.

Биоантиоксидант	CSH	HSH	GSH	RVT
f	1	1	1	2
$k_{\text{x}} \times 10^5, \text{M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$	$4,4 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$

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

Глутатион (GSH) и другие природные тиолы гомоцистеин и цистеин достаточно активно взаимодействуют с радикалами и восстанавливают гидропероксиды. 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. Известно и подтверждено многими авторами, что реакция восстановления H_2O_2 без ферментов происходит в соответствии со стехиометрическим уравнением:



Однако, несмотря на относительно простую стехиометрию реакция протекает по сложному механизму, скорость реакции зависит от соотношения концентраций GSH и H_2O_2 . В деионизированной воде расходование тиолов сопровождается образованием свободных радикалов, сначала обнаруженных методом ингибиторов (Рисунок 6) и затем

идентифицированных методом ЭПР с использованием спиновой ловушки DMPO (Рисунок 7). На Рисунок 6а показано, что расходование акцептора радикалов А, инертного по отношению к тиолу и H_2O_2 , наблюдается только при их совместном присутствии. Из Рисунка 6б следует, что реакционная способность тиолов в генерировании радикалов при взаимодействии с H_2O_2 изменяется в ряду: $\text{CSH} < \text{HSH} \approx \text{GSH}$.

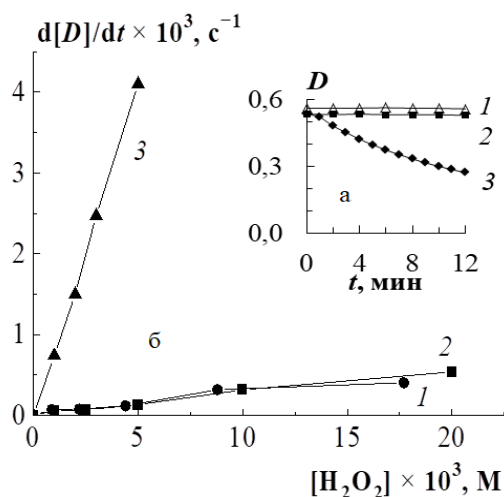


Рисунок 6. а) Расходование $7 \mu\text{M}$ А в присутствии: 1 – 5 mM GSH; 2 – 5 mM H_2O_2 ; 3 – 5 mM GSH с 5 mM H_2O_2 ; б) Зависимость скорости расходования А от концентрации H_2O_2 в присутствии 5 mM тиолов: 1 – GSH; 2 – HSH; 3 – CSH; $[\text{A}] = 10 \mu\text{M}$; водная среда, 37°C .

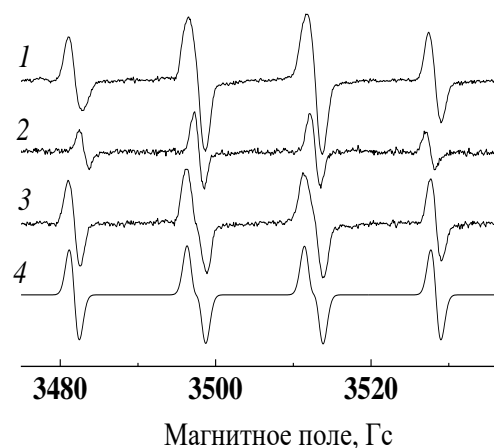


Рисунок 7. ЭПР спектры спиновых аддуктов DMPO, полученных в смеси GSH с H_2O_2 : (1) сумма аддуктов; (2) с радикалом HO^\bullet ; (3) с GS^\bullet ; (4) модельный спектр с константами СТВ GS^\bullet .

Для идентификации свободных радикалов, образующихся при взаимодействии GSH с H_2O_2 , был использован метод спиновой ловушки. На Рисунке 7 представлен экспериментальный спектр ЭПР (1), полученный в растворе, содержащем $21,1 \text{ mM}$ DMPO, 33 mM GSH и 71 mM H_2O_2 при pH 6,2, который представляет собой суперпозицию сигналов двух разных нитроксильных радикалов. Один из них принадлежит спиновому аддукту с HO^\bullet -радикалом, спектр которого (2) с константами СТВ $a_N = 14,9 \pm 0,1 \text{ Гс}$ и $a_H = 15,0 \pm 0,1 \text{ Гс}$ был получен отдельно при УФ-облучении водного раствора, содержащего 10 mM H_2O_2 и $13,3 \text{ mM}$ DMPO. Этот спектр был вычтен из суммарного ЭПР спектра (1). Спектр второго аддукта DMPO с радикалом (спектр 3) совпадает с модельным спектром (4) с константами СТВ нитроксильного радикала: $a_N = 15,2 \pm 0,1 \text{ Гс}$ и $a_H = 16,3 \pm 0,1 \text{ Гс}$, которые соответствуют спиновому аддукту DMPO с тиольным радикалом глутатиона GS^\bullet , полученным рядом авторов при фотолизе дисульфида GSSG. Тиольные радикалы, образующиеся при взаимодействии GSH с H_2O_2 , зарегистрированы впервые.

Скорости расходования глутатиона и скорости иницирования радикалов нелинейно зависят от концентраций GSH и H_2O_2 . Эмпирические зависимости начальной скорости расходования GSH

(W_{GSH}) и скорости инициирования радикалов (W_i), от концентраций GSH и H_2O_2 при разных соотношениях ($0,1 < [\text{GSH}]_0 / [[\text{H}_2\text{O}_2]_0 < 2,5$) имеют вид:

$$W_{\text{GSH}} \cong \text{const} [\text{GSH}]_0^{0,3} [\text{H}_2\text{O}_2]_0^{1,2}, \text{ где } \text{const} = (1,7 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ M}^{-0,5} \times \text{c}^{-1}, \quad (5)$$

$$W_i \cong \text{const} [\text{GSH}]_0^{0,75} [\text{H}_2\text{O}_2]_0^{0,75}, \text{ где } \text{const} = (1,3 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ M}^{-0,5} \times \text{c}^{-1}. \quad (6)$$

Дробные, но разные порядки по концентрациям реагентов указывают на сложный

многостадийный механизм процесса.

Таблица 2. Скорости расходования GSH, образования радикалов и выход радикалов в реакции GSH с $8,6 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ (водный раствор, 37°C).

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

Сопоставление скоростей расходования

глутатиона и образования радикалов

(уравнения (5), (6) и Таблица 2) при

взаимодействии глутатиона с H_2O_2

показывает, что выход радикалов в этой

реакции, равный $e = W_i / W_{\text{GSH}}$, невелик и составляет доли процента от скорости расходования GSH

(W_{GSH}). Однако и небольшой скорости образования радикалов бывает достаточно для

инициирования тиол-ен реакций тиолов с ненасыщенными соединениями.

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

Кинетическая модель

В работе экспериментально исследованы кинетические закономерности взаимодействия GSH

с ресвератролом (RVT) в присутствии H_2O_2 , методом масс-спектрометрии (MS электроспрей

положительных ионов) изучен состав продуктов, образующихся в реакциях GSH с H_2O_2 и с RVT.

С учетом полученных данных о взаимодействии GSH и H_2O_2 , тиол-ен реакции GSH с RVT, а

также имеющихся литературных данных о реакциях GSH, H_2O_2 и тиольных радикалов

разработана кинетическая модель взаимодействия GSH и H_2O_2 и тиол-ен реакции с RVT, которая

хорошо описывает особенности кинетики процесса в широком диапазоне концентраций реагентов

в водной среде при физиологической температуре.

Анализ состава продуктов, образующихся в реакциях GSH с H_2O_2 и с RVT (Рисунок 8)

показал следующее: 1. В исходном растворе GSH присутствуют достаточно устойчивые димеры

[GSH – GSH] (ионы MH^+ 615,17). 2. Основным продуктом окисления GSH в реакции с H_2O_2 в

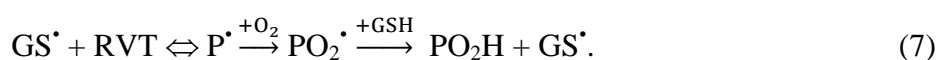
согласии с уравнением (4) является соответствующий дисульфид GSSG (MH^+ 613,16). 3. В смеси

GSH, RVT и H_2O_2 в исходно деионизированной воде основные продукты – дисульфид GSSG (MH^+

613,16) 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:



Скорость расходования RVT (W_{RVT}) линейно возрастает с ростом его начальной концентрации (Рисунок 9). Примечательно, что значения скоростей, отсекаемые линейными зависимостями $W_{RVT} - [RVT]$ на оси ординат, практически (в пределах ошибки) совпадают с расчетными значениями W_i по уравнению (6) для соответствующих концентраций GSH и H_2O_2 . Скорость расходования RVT удовлетворительно описывается уравнением (8), характерным для цепных реакций окисления и полимеризации с квадратичным обрывом цепей на ведущих цепи радикалах:

$$W_{RVT} = W_i + a [RVT] W_i^{0.5}. \quad (8)$$

Здесь параметр $a \cong 1,0 (M \times c)^{-0.5}$ аналогичен отношению констант скорости реакций продолжения (k_p) и обрыва цепей (k_t) $a = k_p / (2k_t)$.

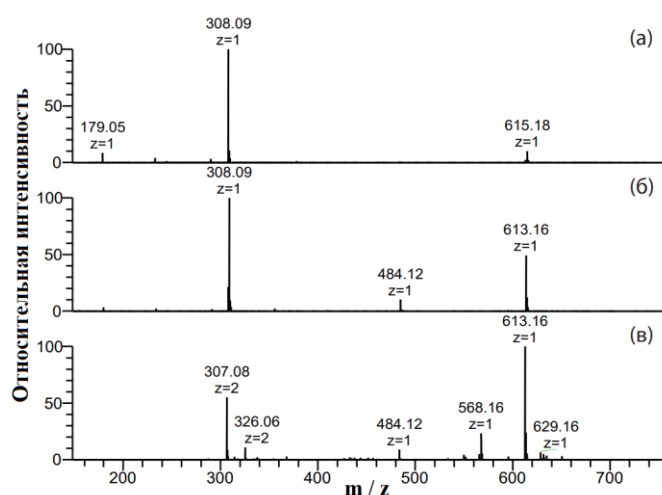


Рисунок 8. Масс-спектры исходного глутатиона (а), продуктов реакции 10 мМ GSH с 2 мМ H_2O_2 (б) и продуктов, образующихся в смеси 2,3 мМ GSH, 1,3 мМ RVT и 3,2 мМ H_2O_2 (в) в деионизированной воде.

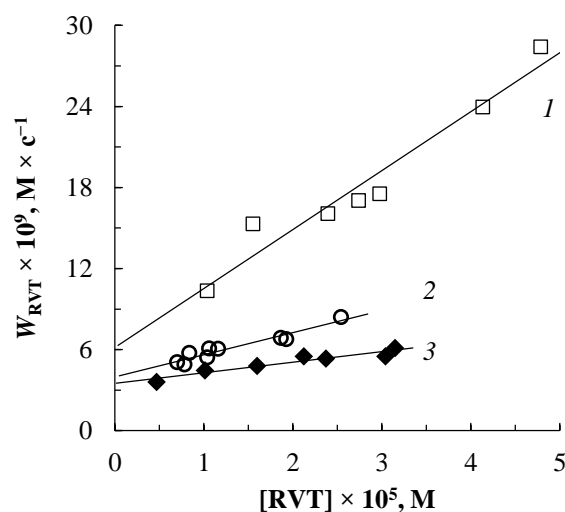


Рисунок 9. Зависимости скоростей расходования RVT (W_{RVT}) от концентрации RVT в реакционной смеси 4,55 мМ H_2O_2 с разными начальными концентрациями GSH (мМ): 1 – 10; 2 – 5; 3 – 2,5.

Для анализа кинетики взаимодействия GSH с RVT в присутствии H_2O_2 использовали компьютерное моделирование. Кинетическую модель (Таблица 3) для описания взаимодействия GSH с H_2O_2 (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 $[GSH - H_2O_2]$ и окисления его в дисульфид GSSG (хотя в масс-спектрах продуктов реакции (Рисунок 8б) не обнаруживается соответствующий комплексу ион MH^+ 342) введены в модель, поскольку в литературе приводятся достаточно убедительные результаты спектроскопических (УФ и ИК) исследований и теоретического анализа образования 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. При конструировании модели было принято, что образование радикалов происходит, в основном, в реакции (VII) димера [GSH – GSH] с H₂O₂, поскольку было установлено, что при рН ≥ 7, когда димеры не образуются, резко уменьшается вплоть до нуля скорость образования радикалов. Реакции (VII) и (VIII), в которых генерируются радикалы, практически не влияют на скорость расходования GSH (W_{GSH}). Тиоловая группа –SH в комплексах с H₂O₂ и димерах определяется реактивом Элмана так же, как в свободном GSH. Величина

Таблица 3. Кинетическая модель взаимодействия GSH с RVT в присутствии H₂O₂ в водной среде при 37 °С.

№№	Реакции	Константы скорости	Значение $k_i, (\text{M} \times \text{c})^{-1}$
I	$\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow [\text{GSH} - \text{H}_2\text{O}_2]$	k_1	5
II	$[\text{GSH} - \text{H}_2\text{O}_2] \rightarrow \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2$	k_2	$*4 \times 10^{-3}$
III	$[\text{GSH} - \text{H}_2\text{O}_2] + \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$	k_3	6×10^{-2}
IV	$\text{GSH} + \text{GSH} \rightarrow [\text{GSH} - \text{GSH}]$	k_4	1,3
V	$[\text{GSH} - \text{GSH}] \rightarrow \text{GSH} + \text{GSH}$	k_5	$*9 \times 10^{-4}$
VI	$[\text{GSH} - \text{GSH}] + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$	k_6	$1,5 \times 10^{-3}$
VII	$[\text{GSH} - \text{GSH}] + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{GS}^{\bullet} + 2\text{H}_2\text{O}$	k_7	2×10^{-5}
VIII	$\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{}^{\bullet}\text{OH} + \text{GS}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}$	k_8	1×10^{-3}
IX	$\text{}^{\bullet}\text{OH} + \text{GSH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{GS}^{\bullet}$	k_9	1×10^6
X	$\text{GS}^{\bullet} + \text{GS}^{\bullet} \rightarrow \text{GSSG}$	k_{10}	1×10^9
XI	$\text{GS}^{\bullet} + \text{RVT} \rightarrow \text{P}^{\bullet}$	k_{11}	$2,5 \times 10^5$
XII	$\text{P}^{\bullet} \rightarrow \text{GS}^{\bullet} + \text{RVT}$	k_{12}	$*1 \times 10^4$
XIII	$\text{P}^{\bullet} + \text{GSH} \rightarrow \text{GS}^{\bullet} + \text{PH}$	k_{13}	5×10^4
XIV	$\text{P}^{\bullet} + (\text{O}_2) \rightarrow \text{PO}_2^{\bullet}$	k_{14}	$**1 \times 10^6$
XV	$\text{PO}_2^{\bullet} + \text{GSH} \rightarrow \text{POOH} + \text{GS}^{\bullet}$	k_{15}	5×10^3
XVI	$\text{GS}^{\bullet} + \text{PO}_2^{\bullet} \rightarrow \text{GSH} + \text{O}_2$	k_{16}	1×10^9
XVII	$\text{GSH} + \text{RVT} \rightarrow [\text{GSH} - \text{RVT}]$	k_{17}	5
XVIII	$[\text{GSH} - \text{RVT}] \rightarrow \text{GSH} + \text{RVT}$	k_{18}	$*2 \times 10^{-4}$
XIX	$[\text{GSH} - \text{RVT}] + \text{GS}^{\bullet} \rightarrow \text{P}^{\bullet} + \text{GSH}$	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.

** $k_{14} = k [\text{O}_2]$ имеет размерность с⁻¹; $[\text{O}_2] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$.

$k_{10} = 10^9 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$ известна для быстрой рекомбинации тиольных радикалов и была определена нами 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, поэтому в модель введены реакции (XI) и (XII). Образующийся в результате присоединения GS^\bullet к RVT алкильный радикал P^\bullet может прореагировать с GSH ($k_{13} \sim 10^5\text{--}10^6 \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$) или с кислородом, поскольку опыты проводили в аэробных условиях ($k_{14} \sim 10^9\text{--}10^{10} \text{ (M} \times \text{c)}^{-1}$). Расчеты по модели показывают, что в присутствии O_2 доминирует квазистационарная концентрация пероксильных радикалов PO_2^\bullet , и увеличивается содержание молекулярных продуктов присоединения тиольных радикалов к RVT. В литературе также отмечается определяющая роль O_2 в изучении кинетики присоединения тиольных радикалов к олефинам методом флеш-фотолиза. Реакции (XVII)–(XIX) введены в модель, поскольку экспериментально обнаружено, что при сопоставимых по масштабу концентрациях глутатиона и ресвератрола вопреки ожиданиям, в присутствии RVT скорость расходования GSH не увеличивается за счет дополнительного расходования в цепной реакции с RVT, а уменьшается.

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.

***N*-ацетилцистеин – тиольный аналог глутатиона в реакциях с активными метаболитами кислорода**

N-ацетилцистеин (ASH) - синтетический тиол, используется с конца 1980-х гг. в качестве муколитического и противовоспалительного лекарственного препарата, а также в условиях окислительного стресса при снижении уровня эндогенного глутатиона.

Подобно реакциям окисления кислородом, окисление тиолов пероксидом водорода является экзотермическим процессом. На Рисунке 10 сопоставлены кинетические кривые тепловыделения при взаимодействии GSH и ASH с H_2O_2 , взятых в стехиометрических соотношениях реакции (4). Видно, что кинетические кривые тепловыделения ($I, 2$) и удельных скоростей тепловыделения ($I', 2'$) практически совпадают. Это указывает на относительную автономность связей S–H и S–S в тиолах и дисульфидах, на которые не оказывают влияния другие группы в молекуле.

В деионизированной воде и при $\text{pH} \leq 7$ ASH в реакции H_2O_2 подобно GSH и другим тиолам генерирует радикалы. На Рисунке 11 представлены экспериментальный спектр суммы аддуктов DMPO с радикалами HO^\bullet и AS^\bullet (1), полученный в растворе с pH 6,2, содержащем 36,9 мМ DMPO, 22 мМ ASH и 59,6 мМ H_2O_2 ; спектр аддукта DMPO с AS^\bullet (2), полученный вычитанием спектра аддукта DMPO с HO^\bullet из суммарного спектра (1), и моделирующий спектр (3), совпадающий с (2), который выявил следующие константы СТВ нитроксильного радикала: $a_N = 15,2 \pm 0,1$ Гс и $a_H = 16,8 \pm 0,1$ Гс, которые характеризуют спиновый аддукт DMPO с захваченным AS^\bullet радикалом.

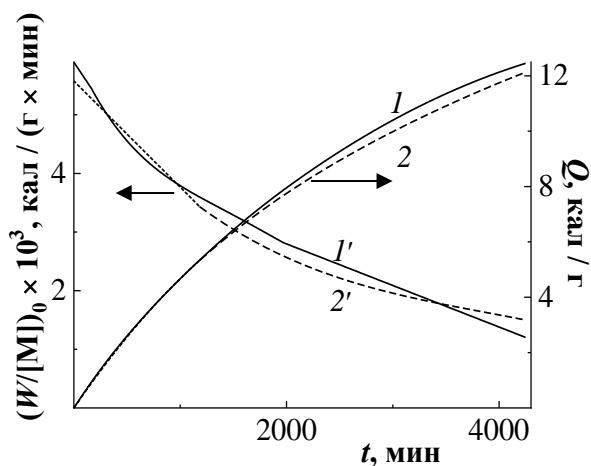


Рисунок 10. Кинетика тепловыделения в реакции ASH (1; 1') и GSH (2; 2') с H_2O_2 в деионизированной воде при $37,7^\circ\text{C}$; концентрации тиолов – 0,1 М, H_2O_2 – 0,05 М.

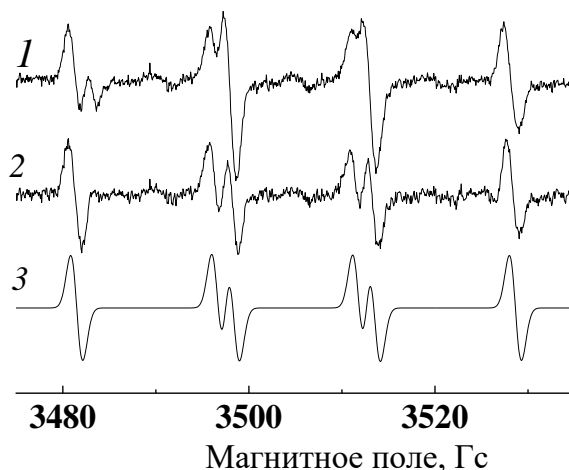


Рисунок 11. ЭПР спектры спиновых аддуктов DMPO, полученных в смеси ASH с H_2O_2 : (1) сумма аддуктов; (2) с AS^\bullet ; (3) модельный спектр с константами СТВ AS^\bullet .

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

Из Рисунка 12, на котором сопоставлены зависимости скорости расходования RVT от его концентрации в растворах ASH и GSH при 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 (8). На оси ординат отсекаются отрезки, близкие по величине к скорости инициирования радикалов, измеренной методом ингибиторов по расходованию акцептора А (Таблица 4). Можно ожидать, что тиол-ен реакция *N*-ацетилцистеина с ресвератролом происходит, аналогично (7), в результате радикально-цепного последовательного присоединения тиольного радикала AS^\bullet и кислорода к RVT:



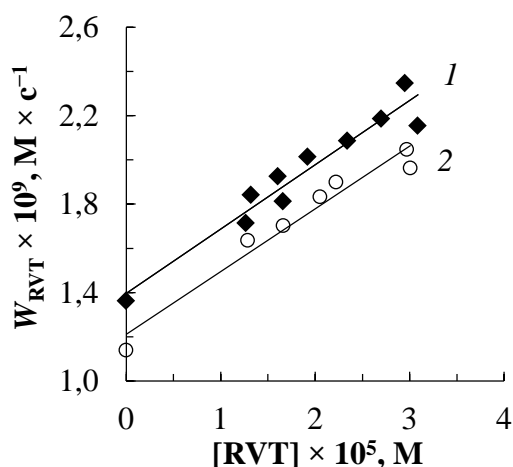


Рисунок 12. Зависимости скорости расщепления RVT (W_{RVT}) от концентрации RVT в реакционной смеси 1,5 мМ H_2O_2 с 2,5 мМ тиола: 1 – GSH; 2 – ASH.

Из Таблицы 4 видно, что значения параметра a , который, согласно уравнению (8), 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 H_2O_2 (Рисунок 10) и свидетельствует о том, что тиольные группы в ASH и GSH действуют автономно.

Глава 5. Влияние pH и ионного состава среды на взаимодействие глутатиона с активными метаболитами кислорода

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 pK_a 2,5 и 3,7. Поэтому в воде GSH образует кислые растворы ($pH \ll 7$), а в щелочных растворах миллимолярная добавка глутатиона может смещать pH в кислую сторону. На Рисунке 13 показано, что скорости расщепления GSH в реакции с H_2O_2 увеличиваются, а скорости иницирования радикалов уменьшаются в фосфатных буферных растворах. При этом при введении GSH в воду pH уменьшается с 7 до 3,25, в фосфатно-солевом буфере PBS с 7,4 до 5,2, а в натрий-калиевом фосфатном буфере (PB) с 7,2 до 6,5. Фосфатные буферные растворы PBS и PB при близких значениях pH сильно отличаются содержанием катионов K^+ и Na^+ .

На Рисунке 14 представлена нетривиальная зависимость начальной скорости расщепления 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 14б). Это означает, что при $pH \geq 7$

Таблица 4. Кинетические характеристики расходования ресвератрола при взаимодействии с тиолами (2,5 мМ) в присутствии H_2O_2 (1,5 мМ), водный раствор, 37 °С.

Тиол	pH	$W_i \times 10^{-9}$, (M × c) ⁻¹	a , (M × c) ^{-0,5}
GSH	3,28 ± 0,02	1,4 ± 0,15	0,8 ± 0,08
ASH	3,31 ± 0,02	1,2 ± 0,15	0,75 ± 0,08

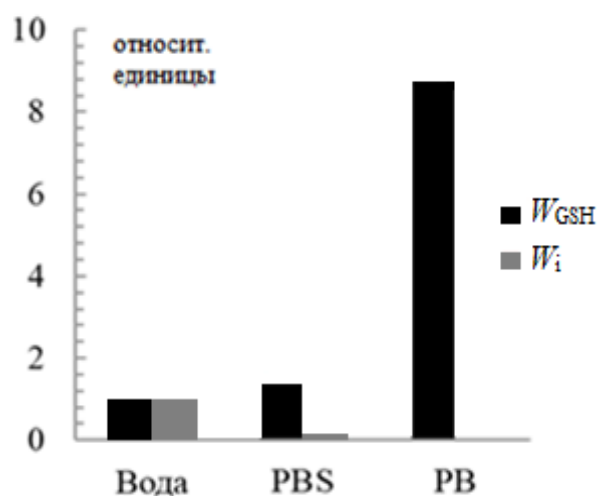


Рисунок 13. Влияние фосфатных буферных растворов PBS и PB на скорости расходования GSH и инициирования радикалов в реакции с H_2O_2 ($[\text{GSH}] = 5 \text{ мМ}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \text{ мМ}$).

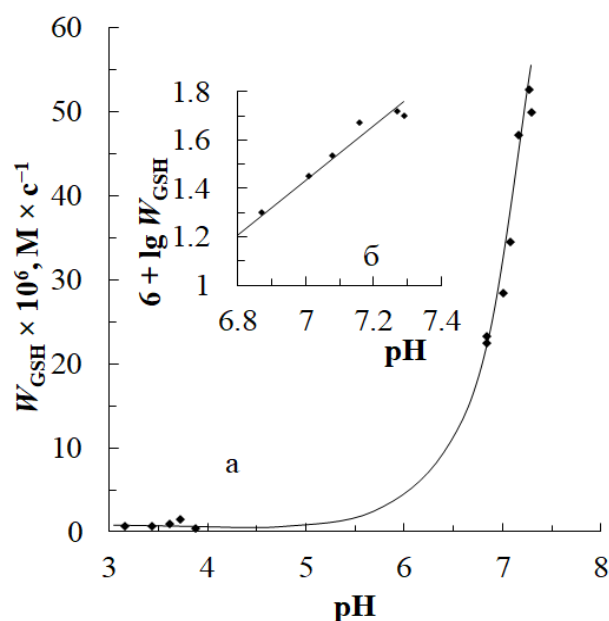
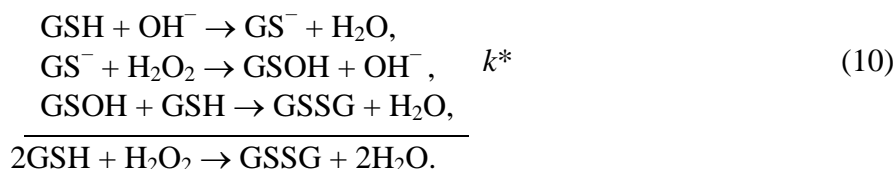


Рисунок 14. а) Влияние pH на скорость расходования 10 мМ GSH в реакции с 2 мМ H_2O_2 в фосфатных буферных растворах; б) Зависимость $\lg W_{\text{GSH}}$ от pH в диапазоне pH 6,8–7,4.

изменяется механизм процесса: расходование GSH определяется концентрацией тиолат-аниона и происходит в основном в реакциях:



В этих реакциях, как и в кислой среде, образуются дисульфид и вода, но лимитирующей стадией является реакция тиолат-аниона (10):

$$W_{\text{GSH}} = 2W_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2k^* [\text{GS}^-] [\text{H}_2\text{O}_2]. \tag{11}$$

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



$$\begin{aligned}
 K_a &= ([\text{GS}^-] [\text{H}^+]) / [\text{GSH}]_0 - [\text{GS}^-], \\
 [\text{GS}^-] &= K_a [\text{GSH}] / ([\text{H}^+] + K_a).
 \end{aligned} \tag{13}$$

Подставляя выражение $[\text{GS}^-]$ из уравнения (13) в (11), получаем:

$$W_{\text{GSH}} = (2k^* \times K_a [\text{GSH}]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]) / ([\text{H}^+] + K_a), \tag{14}$$

т.е. в буферном растворе W_{GSH} пропорциональна произведению концентраций глутатиона и пероксида водорода и зависит от концентрации H^+ . Логарифмирование уравнения (14) приводит к логарифмической зависимости начальной скорости реакции GSH с H_2O_2 от pH в интервале физиологических значений pH 6,8–7,4, где $K_a / ([\text{H}^+] \ll 1$ (15):

$$\lg W_{\text{GSH}} = \lg (2k^* \times K_a) + \lg ([\text{GSH}]_0 [\text{H}_2\text{O}_2]_0) - \lg [\text{H}^+] = \text{const} + \text{pH}, \quad (15)$$

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

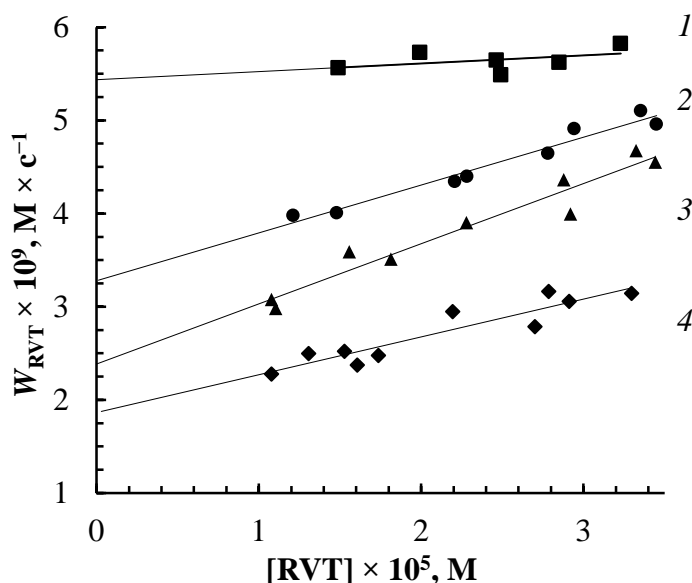


Рисунок 15. Зависимость скорости расщепления RVT (W_{RVT}) от концентрации RVT в реакции 10 мМ GSH с RVT в присутствии 2 мМ H_2O_2 в 4 мМ растворах солей: 1 (■) – AChCl, 2 (●) – NaCl, 3 (▲) – деионизированная вода, 4 (◆) – KCl.

соединениями и биологическими сайтами и влияния этих ионов на поведение тиольных радикалов. К производным холина относится важнейший нейромедиатор ацетилхолин (ACh^+), играющий существенную роль в нервно-мышечной и когнитивной активности живых существ. На Рисунке 15 показано, что скорость расщепления RVT (W_{RVT}) в растворах разных солей в присутствии 10 мМ GSH и 2 мМ H_2O_2 линейно возрастает с ростом концентрации RVT в соответствии с уравнением (8).

В Таблице 5 представлены значения W_i и pH исходного раствора соли и pH реакционной смеси, 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:

$$\text{ACh}^+ > \text{Na}^+ > \text{деионизированная вода} > \text{K}^+. \quad (16)$$

Известно, что в органических средах ацетилхолин образует микроагрегаты с гидропероксидами и ускоряет их распад на радикалы. В водных растворах гидрофильный ACh^+ не влияет на распад гидропероксидов. Участие ACh^+ в увеличении скорости образования радикалов в присутствии GSH и H_2O_2 в водной среде обнаружено впервые.

На Рисунке 16 показано, что расщепление в реакции с H_2O_2 небольшой концентрации GSH, при которой pH водного раствора близок к нейтральному, при добавке в раствор AChCl

Опираясь на детально изученную кинетику расщепления RVT и GSH в присутствии H_2O_2 в бидистилляте и исходно деионизированной воде как на реперную, можно провести оценку влияния ионного состава среды, в частности влияния однозарядных биологически значимых катионов, на реакционную способность глутатиона в этих реакциях.

В последние годы возобновился интерес к реакциям биологического связывания однозарядных катионов Li^+ , Na^+ , K^+ и органических катионов, производных холина (R_4N^+) с модельными

ускоряется по сравнению с расходом 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.

Таблица 5. Кинетические характеристики расходования 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 °С.

Соль, 4мМ	pH раствора	pH реакционной смеси	$W_i \times 10^9$, $M \times c^{-1}$	$a, (M \times c)^{-0.5}$
KCl	6,15	3,04	1,9	0,9
Вода	7,00	3,10	2,4	0,8
NaCl	6,47	3,07	3,4	0,75
AChCl	4,90	3,02	5,4	0,1
К-фосфатный буфер	7,43	7,29	0	0
Na-фосфатный буфер	7,43	7,27	0	0

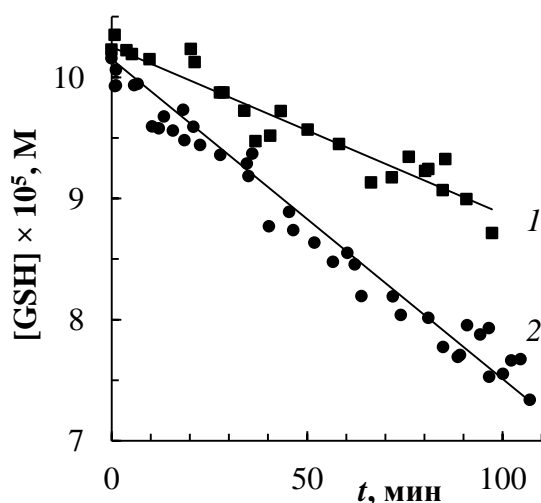


Рисунок 16. Кинетические кривые расходования 0,1 мМ GSH при взаимодействии с 0,02 мМ H_2O_2 в чистой воде (■1) и в 4 мМ водном растворе AChCl (●2), 37 °С.

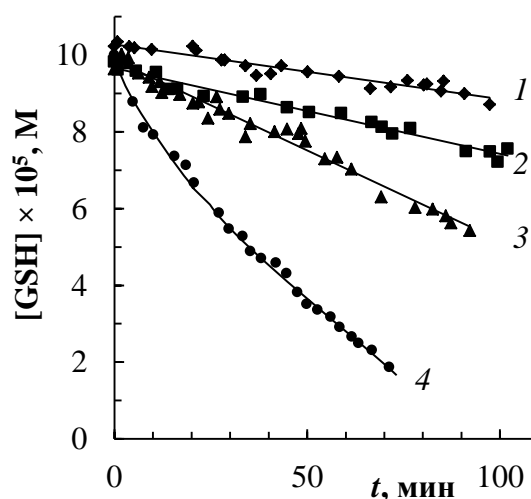


Рисунок 17. Кинетические кривые расходования 0,1 мМ GSH при взаимодействии с 0,02 мМ H_2O_2 в чистой воде (◆1) и в буферных растворах PBS (■2); Na-фосфатном буфере (▲3); K-фосфатном буфере (●4); 37 °С, pH 7,35.

На Рисунке 17 сопоставлено влияние фосфатных буферных систем PBS, Na-фосфатного и K-фосфатного буферов с одинаковыми значениями pH в реакционной смеси на скорость расходования такой же, как на Рисунке 16, небольшой концентрации GSH при взаимодействии с H_2O_2 , взятой в стехиометрическом соотношении 2 : 1. Видно, что в буферных растворах W_{GSH} значительно больше, чем в деионизированной воде. Но несмотря на одинаковые pH 7,35, скорость расходования GSH увеличивается в ряду: вода < PBS < Na-фосф. < K-фосф. в соотношении 1 : 1,4 : 3,4 : 8,4. Ионы K^+ специфически взаимодействуют с GSH: увеличивают скорость

окисления GSH пероксидом водорода, но при этом уменьшают выход радикалов в этой реакции по сравнению с другими катионами.

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 достаточный для инициирования цепных тиол-ен реакций 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 . Разработана кинетическая модель реакции GSH с H_2O_2 и сопряженной тиол-ен реакции GSH с RVT в исходно деионизированной воде. Компьютерное моделирование на основе модели удовлетворительно описывает особенности кинетики процессов в широком диапазоне концентраций реагентов. Совокупность полученной кинетической информации может служить реперным (стандартным) кинетическим пакетом при изучении влияния компонентов водной среды на поведение тиолов в реакциях с активными метаболитами кислорода и разработке потенциальных лекарственных препаратов.

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, *N*-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.

Благодарности

Автор выражает благодарность Центру коллективного пользования ИБХФ РАН в том числе профессору, д.х.н. В. А. Кузьмину, к.х.н. А. А. Костюкову, д.ф.-м.н. М. В. Мотякину, н.с. М. И. Индейкиной, к.х.н. М. П. Березину (ИПХФ РАН), к.х.н. Д. В. Лошадкину (ЯрГУ) и к.х.н. И. Ф. Русиной.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ***Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:***

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.