

На правах рукописи

ЖУРАВЛЕВА Юлия Сергеевна

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ АМИНОКИСЛОТЫ ТРИПТОФАН В
РЕЗУЛЬТАТЕ РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ, ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ
КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Специальность 1.3.17 – Химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН).

**Научный
руководитель**

Шерин Петр Сергеевич

кандидат физико-математических наук, с.н.с. группы фотоиндуцированных процессов МТЦ СО РАН

**Официальные
оппоненты**

Селюгина Ольга Юрьевна

кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории магнитных явлений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Мерещенко Андрей Сергеевич

доктор химических наук, доцент кафедры лазерной химии и лазерного материаловедения Института химии Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург

**Ведущая
организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

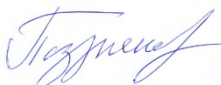
Защита диссертации состоится “6” ноября 2024 года в 15-00 часов на заседании Диссертационного совета Д 003.014.02 при ФГБУН Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН) по адресу: 630090, Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещён на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ИХКГ СО РАН, учёному секретарю диссертационного совета ; e-mail: ref_dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан “ ” _____ 2024 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



И. П. Поздняков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Свободнорадикальная теория старения, предложенная в 1950-х годах XX века, объясняла возрастную потерю функций органов и тканей накоплением необратимых окислительных повреждений компонентов живых тканей в результате их реакций с активными формами кислорода (АФК). Принципиальная роль окислительных повреждений в процессе старения так и осталась недоказанной, однако была показана их значимая, а порой и основная роль в развитии ряда сердечно-сосудистых заболеваний, хронической болезни почек, нейродегенеративных болезней, катаракты, диабета и других заболеваний.

Среди клеточных компонентов структурные белки являются наиболее представленными мишенями для АФК в силу их высоких концентраций в клетках, а также отсутствия обновления на протяжении десятилетий, что способствует накоплению окислительных повреждений белков. Наиболее ярким примером долгоживущих белков являются белки хрусталика глаза, присутствующие в составе ткани на протяжении всей жизни человека.

Среди аминокислотных остатков белков остатки триптофана (TrpH) и тирозина (TyrOH) являются особенно уязвимыми для окислительных повреждений вследствие легкости их одноэлектронного окисления. Реакции TrpH и TyrOH с некоторыми АФК и свободными радикалами приводят к образованию радикалов Trp[•] и TyrO[•], соответственно. В случае наружных тканей, подвергающихся воздействию ультрафиолетового (УФ) излучения, таких как кожа и хрусталик глаза, к числу окислителей также относятся возбужденные триплетные состояния природных фотосенсибилизаторов.

Среди биологически важных продуктов повреждения TrpH и TyrOH, обнаруживаемых *in vivo*, можно выделить два класса соединений – модификации с присоединением одного и более атомов кислорода, т.н. оксигенированные формы, а также внутри- и межмолекулярное ковалентное связывание с другими аминокислотными остатками, т.н. кросс-сшивки. Повышенное содержание данных модификаций обнаруживается в местах протекания воспалительных процессов, при развитии некоторых возрастных дегенеративных расстройств, а также в составе хрусталика глаза, пораженного катарактой. Примечательно, что фотосенсибилизированное повреждение TrpH в модельных системах также приводит к появлению данных продуктов.

Понимание того, как условия среды влияют на механизмы и продукты окислительного повреждения TrpH, может помочь в разработке новых подходов к замедлению и предотвращению наиболее опасных последствий воздействия АФК на белки живых тканей. Сложный химический состав и малая концентрация радикалов в клетках затрудняет

изучение радикальных реакций, поэтому исследователи прибегают к использованию модельных систем для генерации высоких концентраций свободных радикалов. Одним из таких методов является фотосенсибилизированный фотолиз аминокислот и белков. Настоящая работа посвящена исследованию молекулярных механизмов повреждения TrpH в результате радикальных реакций, фотоиндуцируемых кинуреновой кислотой (KNAH^-), которая является естественным фотосенсибилизатором хрусталика глаза человека, поглощающим свет в УФ-А диапазоне (315-400 нм), и характеризуется высоким квантовым выходом триплетных состояний ($^3\text{KNAH}^-$), около 80 %.

Степень разработанности темы исследования

Общие представления о реакциях с участием Trp \cdot были сформулированы ранее, однако влияние среды на протекание данных реакций во многом остаётся неизвестным. Доминирующее число исследований биологически значимых радикальных реакций проведено для водных растворов при pH 7. Однако известно, что условия повышенных концентраций АФК и свободных радикалов в живых клетках, также известные под названием Окислительный Стресс (ОС), зачастую сопровождаются снижением pH клеточной среды, что необходимо учитывать при моделировании последствий радикальных реакций *in vivo*.

Одним из продуктов KNAH^- -фотосенсибилизированного фотолиза TrpH и TrpH-содержащих белков являются продукты ковалентного присоединения KNAH^- к TrpH (KNAH-Trp), выход которых повышен в случае белка. Учитывая присутствие KNAH^- в составе хрусталика глаза, подвергающегося воздействию УФ излучения, образование данной модификации может ожидатьсся и *in vivo*. Информация о механизме образования KNAH-Trp может помочь не только в оценке вероятности образования данной модификации *in vivo*, но также и в увеличении квантового выхода её образования, что необходимо для дальнейшего исследования фотохимических свойств KNAH-Trp .

Одним из важных источников образования оксигенированных форм TrpH является быстрая реакция Trp \cdot с супероксид-анионом, $\text{O}_2^{\cdot-}$, – основным предшественником АФК в живых клетках. Несмотря на значимость данной реакции для химии ОС, выход оксигенированных форм TrpH в ней оценивается разными исследователями на уровне < 5% или \approx 100% в зависимости от метода генерации Trp \cdot . Разрешение данного противоречия позволит сделать окончательный вывод о том, является ли данная реакция опасным источником оксигенирования TrpH.

Целью диссертационной работы является исследование механизмов и продуктов повреждения аминокислоты TrpH и аминокислотного остатка TrpH в составе модельного белка в результате радикальных реакций, фотоиндуцированных KNAH^- .

В ходе работы были поставлены и успешно решены следующие задачи:

1. Определение механизма реакции между триплетным состоянием KNAH^- ($^3\text{KNAH}^-$) и TrpH как источника Trp^* в фотохимической системе.
2. Установление влияния pH на механизмы и состав продуктов радикального повреждения аминокислоты TrpH и аминокислотного остатка TrpH в составе лизоцима белка куриного яйца (Hen Egg White Lysozyme, HEWL), выбранного в качестве модельного белка.
3. Установление радикального предшественника ковалентных сшивок между TrpH и KNAH^- .
4. Определение механизма реакции между Trp^* и $\text{O}_2^{\bullet-}$ как потенциального источника оксигенированных форм TrpH .

Научная новизна работы

В ходе исследований реакции между $^3\text{KNAH}^-$ и TrpH был описан ранее неизвестный вариант механизма последовательного переноса электрона и протона, при котором протон переносится непосредственно к акцептору электрона – триплетному состоянию фотосенсибилизатора. Впервые были установлены механизмы влияния pH раствора на кинетику радикальных реакций TrpH и характер повреждений в случае свободной аминокислоты, так и аминокислотного остатка в составе белка. В ходе поиска радикального предшественника KNAH-Trp было показано существование ранее неизвестной реакции фотоиндуцированного диспропорционирования KNAH^- . Механизм реакции между Trp^* и $\text{O}_2^{\bullet-}$ был впервые исследован при помощи регистрации кинетики восстановления основного состояния TrpH и анализа кинетики гибели Trp^* , что позволило разрешить противоречия между результатами ранних исследований.

Практическая значимость и использование полученных результатов

Значимость результатов настоящей работы для фундаментальных исследований состоит в углублении знаний о механизмах и продуктах первичных фотохимических процессов, приводящих к образованию Trp^* , а также последующих реакций Trp^* , приводящих к формированию модификаций TrpH . Полученная информация дополняет понимание роли условий среды (pH, концентрация молекулярного кислорода) в развитии различных заболеваний, связанных с воздействием АФК и УФ излучения. Впоследствии полученные данные могут использоваться исследователями как для разработки стратегий защиты клеток от окислительных повреждений, так и для увеличения выходов продуктов модифицирования TrpH для дальнейшего изучения их биохимических свойств. Один из результатов настоящей работы указывает на возможные механизмы антиоксидантной активности KNAH^- , о которой ранее было сообщено в литературе.

Методология и методы исследования

В качестве основного метода исследования в диссертационной работе использовался метод лазерного импульсного фотолиза для регистрации кинетических кривых промежуточного поглощения (transient absorption, TA) радикальных частиц. Математический анализ кинетических данных промежуточного поглощения проводился с помощью пакета программ Matlab. Для идентификации и количественной оценки стабильных продуктов фотолиза был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с оптическим и масс-спектрометрическим (МС) детектированием продуктов. Для оценок выходов кросс-сшивок HEWL был использован метод гель-электрофореза в полиакриламидном геле.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ранее неизвестный для TrpH вариант механизма последовательного переноса электрона и протона от TrpH к ${}^3\text{KNAH}^-$ с непосредственным переносом протона к акцептору электрона без участия растворителя. Образование Trp^{\bullet} и $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ как непосредственных продуктов реакции между TrpH и ${}^3\text{KNAH}^-$.

2. Значимая роль кислотно-основного равновесия радикала триптофана при повреждении свободной аминокислоты TrpH в радикальных реакциях, фотоиндуцированных кинуреновой кислотой. Снижение степени фотоиндуцированного повреждения свободной аминокислоты без изменений в характере повреждений TrpH при понижении pH водной среды обусловлено повышенными окислительными свойствами катион-радикала $\text{TrpH}^{+\bullet}$ по сравнению с Trp^{\bullet} . Высокая pH-чувствительность характера повреждений аминокислотных остатков TrpH в составе лизоцима обусловлена высокой конкуренцией реакций присоединения кислорода и димеризации за радикальные центры Trp^{\bullet} , а также высокой pH-зависимостью констант скорости данных реакций.

3. Источником радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$, способного вступать в реакцию ковалентного присоединения с другими радикалами, является реакция фотоиндуцированного диспропорционирования KNAH^- .

4. Высокий выход оксигенированных форм TrpH в реакции между Trp^{\bullet} и $\text{O}_2^{\bullet-}$ делает данную реакцию опасным источником повреждения TrpH. KNAH^- не является эффективным фотохимическим генератором $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Личный вклад соискателя

Автор работы участвовал в постановке задач, разработке планов, обсуждении полученных результатов и формулировке выводов настоящего исследования. Все результаты, описанные в настоящей работе, были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии.

Степень достоверности и апробация результатов исследований

Достоверность научных результатов определяется комплексным подходом к экспериментальным исследованиям с использованием разнообразных методик и научного оборудования, воспроизводимостью нескольких независимых экспериментов, сопоставлением результатов с имеющимися в литературе данными, а также применением математической обработки экспериментальных данных. Научность обсуждений и выводов подтверждается их принятием мировым научным сообществом: публикацией результатов в виде статей в рецензируемых тематических журналах, а также презентацией в виде устных докладов на международных и Российских научных конференциях.

По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы. Содержание диссертации было представлено в виде устных докладов на XVII Конгрессе Международного Союза по Фотобиологии (Барселона, Испания) и XI Международной конференции для молодых ученых по химии (Санкт-Петербург) в 2019 году, Центрально-европейской конференции по фотохимии (Бад Хофгаштайн, Австрия) в 2020 году, XIII Симпозиуме «Современная химическая физика» (Туапсе) в 2021 г. и X Международной конференции им. В.В. Воеводского «Физика и химия элементарных химических процессов» (Новосибирск) в 2022 г.

Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Работа соответствует пунктам 1 «механизмы химического превращения, экспериментальные методы исследования структуры и динамики химических превращений» и 9 «строение, структура и реакционная способность интермедиатов химических реакций».

Связь работы с научными программами и грантами

Работа проводилась согласно плану НИР Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института «Международного томографического центра» Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск), а также в рамках проекта РНФ 18-73-10014 (руководитель П.С. Шерин).

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из списка используемых сокращений, введения, семи глав, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Диссертация изложена на 189 страницах и включает 21 таблицу (из них 11 в приложении), 68 рисунков (из них 38 в приложении), 14 схем (из них 1 в приложении). Библиография включает 280 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Здесь и далее в тексте обозначение TrpH будет использоваться для описания общих свойств, характерных для всех производных триптофана. Для указания L-триптофана, N-ацетил-L-триптофана и N-ацетил-O-метил-триптофана будут использованы обозначения LTrpH, NTrpH и NTrpHOMe, соответственно.

1. Механизм реакции между ${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH

Предыдущие исследования реакции между ${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH предполагали, что она протекает по механизму переноса электрона (electron transfer, ET) от TrpH к ${}^3\text{KNAH}^-$, что, однако, не было подтверждено напрямую. Известно, что равновесие $\text{TrpH}^+/\text{Trp}^*$ характеризуется значением рКа в диапазоне 4-5 в зависимости от производного TrpH, при этом кислотно-основные формы могут быть различены по спектрам поглощения [1]. В настоящей работе механизм реакции был установлен с помощью варьирования рН раствора: в случае, если форма радикала TrpH, образующаяся в реакции между ${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH, не соответствует равновесной форме для выбранного рН, кинетическая кривая ТА будет отражать процесс достижения кислотно-основного равновесия.

Спектры ТА, зарегистрированные при рН 4.2, см. Рис. 1.1 (А), показывают, что быстрое тушение 80 нс после поглощения лазерного импульса приводит к образованию Trp^* , см. Рис. 1.1 (А), (Б). В течение следующих 0.4 мкс максимум полосы поглощения смещается с 510 на 570 нм, что отражает появление катион-радикала, $\text{TrpH}^{+\bullet}$ вследствие протонирования Trp^* , см. Рис. 1.1 (А), (Б).

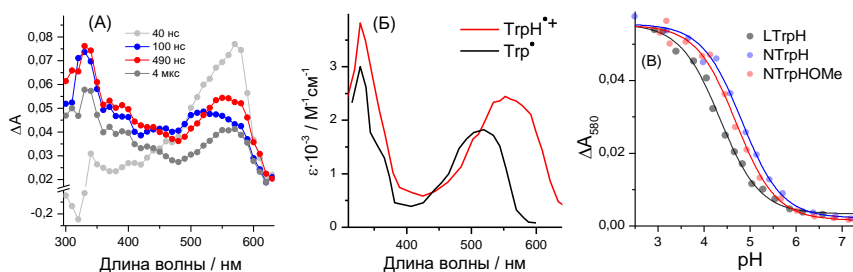
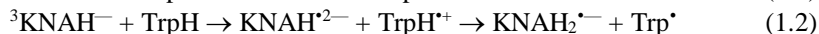
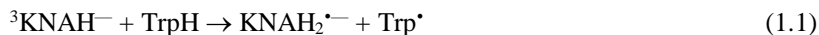


Рис. 1.1. (А) Спектры ТА, зарегистрированные после облучения лазерным импульсом (355 нм) раствора KNAH^- и NTrpH, при рН 4.2. (Б) Спектры поглощения $\text{TrpH}^{+\bullet}$ и Trp^* [1]. (В) рН-зависимости значений ΔA_{580} (4 мкс) для производных TrpH; Гладкие кривые соответствуют аппроксимации экспериментальных данных для случая одного значения рКа.

Возможными механизмами реакции, приводящими к образованию Trp^{\bullet} , могут быть перенос атома водорода от TrpH к ${}^3\text{KNAH}^-$, реакция (1.1), или последовательный перенос электрона и протона (proton-coupled electron transfer, PCET), реакция (1.2).



Значение Кинетического Изотопного Эффекта (КИЭ) константы скорости реакции между ${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH (k_q) дало значение 1.3, см. Таблицу 1.1. Невысокое значение КИЭ < 2 характерно для реакций, протекающих по PCET механизму, тогда как для механизма переноса атома водорода значения КИЭ превышают фактор 2. Таким образом, реакция между ${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH протекает по двухступенчатому механизму с переносом электрона на первом этапе, за которым следует перенос протона от TrpH^+ к KNAH^{2-} . Насколько известно автору настоящей работы, обнаруженная реакция является первым случаем PCET механизма для TrpH , при котором протон переносится от TrpH^+ непосредственно к радикалу фотосенсибилизатора, а не в объем растворителя.

Таблица 1.1. Значения константы скорости реакции, k_q , и КИЭ = $k_q(\text{H}_2\text{O})/k_q(\text{D}_2\text{O})$ при pH 3 и 7.

pH	$k_q(\text{H}_2\text{O})/10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_q(\text{D}_2\text{O})/10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	КИЭ
3	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.3
7	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.3

Эксперименты с LTrpH и NTrpOHMe показали, что заместители в основной цепи аминокислоты не влияют на PCET механизм реакции с ${}^3\text{KNAH}^-$. Спектроскопическое титрование катион-радикалов данных производных позволило установить значения $\text{pKa}(\text{TrpH}^+)$, равные 4.3, 4.8 и 4.7 для LTrpH , NTrpH и NTrpOHMe , соответственно, см. Рис. 1.1 (B). Информация о $\text{pKa}(\text{NTrpH}^+)$ и $\text{pKa}(\text{NTrpOHMe}^+)$ ранее отсутствовала в литературных данных.

Следствием PCET механизма реакции между ${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH является образование анион-радикала $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$, который подвергается протонированию при $\text{pH} < 5.5$ [2] с образованием нейтрального радикала KNAH_3^{\bullet} . Образование радикала Trp^{\bullet} в PCET механизме реакции имеет два биологических последствия. Во-первых, образование нейтрально заряженной частицы не допускает появления заряженных промежуточных продуктов в белковой среде, характеризующейся низкой диэлектрической проницаемостью. Во-вторых, Trp^{\bullet} является менее сильным окислителем по сравнению с TrpH^+ . Таким образом, непосредственные продукты реакции

${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH являются менее опасными интермедиатами в случае их образования в белковой среде.

2. Влияние pH на радикальные реакции между кинуреновой кислотой и аминокислотами TrpH и TyrOH

Известно, что ОС, являющийся предпосылкой многих заболеваний, может сопровождаться ацидозом – снижением pH внутриклеточной среды. Не исключается что протонирование радикалов $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ и Trp^\bullet при снижении pH может изменять исход радикальных реакций повреждения белков, ранее изученных для растворов с нейтральным значением pH. В Главе 4 диссертационной работы описаны результаты исследования влияния pH на KNAH^- -фотоиндуцированное повреждение TrpH в свободном состоянии. Для более надёжного отнесения наблюдаемых pH-эффектов к свойствам того или иного радикала были проведены эксперименты с производными аминокислоты TrpH (LTrpH , NTrpH и NTrpHOMe) и N-ацетил-тирозином (NTyrOH). Радикал $\text{TyrOH}^{\bullet+}$ имеет значение $pK_a = -2$, и в широком диапазоне pH 0–12 присутствует лишь одна кислотно-основная форма, TyrO^\bullet . Таким образом, в последнем случае потенциальные pH-зависимые изменения следует относить к различию химических свойств $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ и KNAH_3^\bullet .

Эксперименты с TrpH проводились в водных растворах при значениях pH, соответствующих различным парам кислотно-основных форм радикалов KNAH^- и производных TrpH :

- (1) $\text{KNAH}_3^\bullet + \text{TrpH}^{\bullet+}$ при pH 3.2;
- (2) $\text{KNAH}_3^\bullet + \text{Trp}^\bullet/\text{TrpH}^{\bullet+}$ при pH 4.9;
- (3) $\text{KNAH}_2^{\bullet-}/\text{KNAH}_3^\bullet + \text{Trp}^\bullet$ при pH 5.5.
- (4) $\text{KNAH}_2^{\bullet-} + \text{Trp}^\bullet$ при pH 7.4.

Соотношение $\text{Trp}^\bullet/\text{TrpH}^{\bullet+}$ при pH 4.9 имеет различные значения для производных TrpH , см. Раздел 1. Все эксперименты проводились при анаэробных условиях с незначительным влиянием растворенного кислорода, $C(\text{O}_2) < 15$ мкМ. Значения квантовых выходов деградации реагентов, $\Phi_{\text{deg}}(\text{NTyrOH})$, $\Phi_{\text{deg}}(\text{TrpH})$ и $\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^-)$, были рассчитаны по линейной области динамики распада реагентов. Полученные зависимости Φ_{deg} от pH представлены на Рис. 2.1.

В случае фотолиза NTyrOH влияние протонирования $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ на его реакцию с NTyrO^\bullet невелико, что указывает на незначительное различие в окислительно-восстановительных свойствах $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ и KNAH_3^\bullet . В случае производных TrpH снижение pH от 7.4 до 3.2 приводит к заметному снижению $\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^-)$ и $\Phi_{\text{deg}}(\text{TrpH})$. При этом для всех производных TrpH значения Φ_{deg} при pH 5.5 и 7.4 оказались близки, что дополнительно подтверждает схожесть окислительно-восстановительных свойств $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ и KNAH_3^\bullet . Снижение значений Φ_{deg} наблюдаются в ситуациях

полного (при pH 3.2) или частичного (при pH 4.9) протонирования радикалов Trp^{\bullet} в кислой среде, см. черные пунктирные линии на Рис. 2.1.

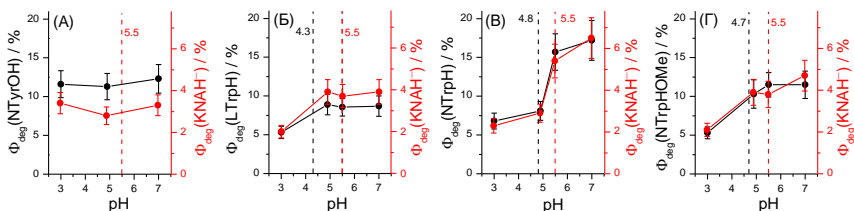


Рис. 2.1. Зависимость значений Φ_{deg} от pH для KNAH^- и (А) NTyrOH , (Б) LTrpH , (В) NTrpH и (Г) NTrpHOMe при анаэробном УФ-А фотолизе (355 нм, 3 мДж/импульс, 10 Гц); пунктирные линии – значения pK_a для KNAH_3^+ (красный) и TrpH^+ (черный).

Основными продуктами фотолиза аминокислот являются их димерные формы. Выходы димеров NTyrOH практически нечувствительны к изменению pH, однако выходы димеров TrpH падают при снижении pH вместе с падением $\Phi_{\text{deg}}(\text{TrpH})$, см. Рис. 2.2 (А). Стоит отметить, что доля димеров среди продуктов TrpH дополнительно падает при протонировании индольного кольца Trp^{\bullet} , см. Рис. 2.2 (Б). Вероятно, наблюдаемый эффект связан со снижением эффективности комбинации TrpH^+ из-за кулоновского отталкивания между одноименно заряженными фрагментами индольных колец.

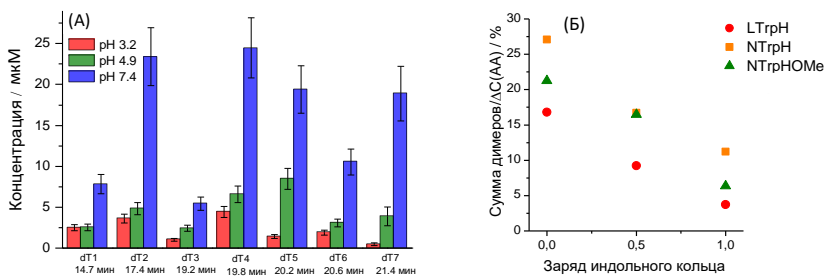


Рис. 2.2. (А) pH-зависимость концентрации димеров NTrpH (dT) с соответствующими значениями времени удержания на колонке. (Б) Зависимость доли образовавшихся димеров среди продуктов TrpH от заряда индольного кольца.

Аппроксимация кинетических кривых ГА, соответствующих гибели $\text{KNAH}_2^{\bullet-}/\text{KNAH}_3^+$ и $\text{Trp}^{\bullet}/\text{TrpH}^+$, с помощью кинетической схемы реакций (2.1)-(2.3) показала, что снижение значений $\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^-)$ и $\Phi_{\text{deg}}(\text{TrpH})$ в кислой среде без существенных изменений в составе продуктов обусловлено увеличением константы скорости обратного переноса электрона ($k_{\text{опэ}}$) в реакции (2.1) в кислой среде.



Полученные значения $k_{\text{ОПЭ}}$ приведены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Значения $k_{\text{ОПЭ}}/10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при различных значениях pH.

pH	LTrpH	NTrpH	NTrpHOMe
3.2	3.6±1.1	3.7±1.1	4.1±1.2
4.9	3.0±0.9	3.1±0.9	2.7±0.8
7.4	2.5±0.7	2.1±0.6	2.4±0.7

Повышенные значения $k_{\text{ОПЭ}}$ в случае TrpH^{++} согласуются с повышенным окислительно-восстановительным потенциалом пары $\text{TrpH}^{++}/\text{TrpH}$ (1.19 В) по сравнению с Trp^*/TrpH (1.00 В), что обуславливает двукратное увеличение значения $k_{\text{ОПЭ}}$ в кислой среде. Результаты настоящей главы дают основания предполагать, что в случае увеличения значения $\text{pKa}(\text{TrpH}^{++})$ до 5.5–6.0, например, внутри белковой глобулы, ускорение ОПЭ между TrpH^{++} в составе белка и радикалом KNAH^- будет происходить даже при слабокислом значении pH.

3. Влияние pH на механизмы и продукты фотоиндуцированных реакций между кинуреновой кислотой и аминокислотными остатками триптофана и тирозина в составе белка лизоцима

В Главе 5 диссертации описаны результаты исследования влияния pH на механизмы и продукты фотоиндуцированных радикальных реакций между KNAH^- и аминокислотными остатками TrpH и TyrOH в составе белка HEWL. HEWL содержит в своем составе шесть аминокислотных остатков TrpH и три остатка TyrOH и был выбран в качестве модельного белка, поскольку в литературе имеется большое количество данных о его структуре и физико-химических свойствах.

Полагая, что для анаэробных тканей, например, для ядра хрусталика глаза, где $\text{C}(\text{O}_2) < 2 \text{ мкМ}$, наиболее физиологически значимыми являются прямые реакции между радикалами фотосенсибилизаторов и белками, все дальнейшие эксперименты проводили при анаэробных условиях.

Спектры ТА раствора KNAH^- и HEWL при различных значениях pH показали, что при значениях pH 3-7 основным продуктом реакции между $^3\text{KNAH}^-$ и HEWL является Trp^* , при этом снижение pH раствора приводит к увеличению вклада остатков TyrOH в дезактивацию $^3\text{KNAH}^-$. В работе [2] было показано, что константа скорости реакции между $^3\text{KNAH}^-$ и свободной аминокислотой TrpH (k_q) не зависит от pH в диапазоне 3-7, тогда как для TyrOH k_q увеличивается в два раза при снижении pH от 7 до 3. Предполагая аналогичную pH-зависимость для белка, $k_q(\text{HEWL})$ была измерена с помощью лазерного импульсного фотолиза см. Таблицу 3.1.

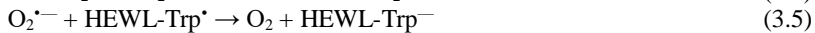
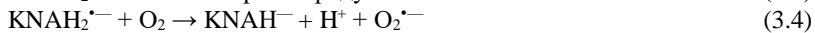
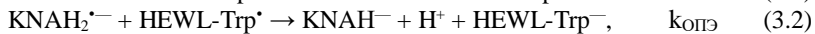
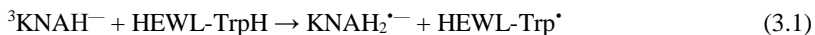
Значения $k_q(\text{HEWL})$ не показывают однозначной зависимости от pH, что указывает на (1) незначительный вклад увеличения скорости реакции между ${}^3\text{KNAH}^-$ и остатком TrpH в кислой среде и (2) малое влияние pH на доступность остатков TrpH при снижении pH от 7 до 3.

Таблица 3.1. Значения $k_q(\text{HEWL})$, квантовых выходов разложения KNAH^- , $\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^-)$, и HEWL, $\Phi_{\text{deg}}(\text{HEWL})$, и образования димерных форм HEWL, $\Phi_{\text{dim}}(\text{HEWL})$.

pH	$k_q(\text{HEWL}) / 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^-) / \%$	$\Phi_{\text{deg}}(\text{HEWL}) / \%$	$\Phi_{\text{dim}}(\text{HEWL}) / \%$
3.1	0.8 ± 0.2	2.7 ± 0.7	1.5 ± 0.2	0.06 ± 0.01
4.9	1.5 ± 0.3	2.9 ± 0.5	1.9 ± 0.3	0.11 ± 0.02
7.3	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.3	0.76 ± 0.11

Оптическое титрование HEWL-TrpH⁺ показало значение pKa 3.1, что значительно ниже значения pKa(TrpH⁺) для TrpH в свободном состоянии (Раздел 1). Объяснением столь значительного смещения pKa может быть дестабилизация третичной структуры HEWL при образовании положительного заряда на остатке TrpH в составе белка.

Реакция между ${}^3\text{KNAH}^-$ и HEWL-TrpH приводит к следующему набору радикальных реакций:



Реакция ОПЭ с восстановлением исходных реагентов, реакция (3.2), является основным каналом гибели $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ и $\text{HEWL-Trp}^{\bullet}$. Однако вследствие пониженного значения $k_{\text{ОПЭ}}$ для объемной молекулы HEWL по сравнению со случаем свободных аминокислот, возрастает вклад реакции окисления $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ молекулярным кислородом, реакция (3.4), что приводит к появлению в смеси супероксид-аниона, $\text{O}_2^{\bullet-}$. Пути реакций между $\text{O}_2^{\bullet-}$, и $\text{HEWL-Trp}^{\bullet}$, реакции (3.5) и (3.6), не были исследованы отдельно друг от друга; суммарная константа скорости реакций (3.5) и (3.6), k_s , составляет значение $0.9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при pH 6.2 [3]. Константа скорости реакции (3.7), k_d , при pH ≈ 7 равна $(1-6) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [3]. Таким образом, основное повреждение белковой глобулы происходит в результате реакций (3.3), (3.6) и (3.7).

Аппроксимация кинетических кривых гибели радикалов схемой реакций (3.1)-(3.7) показала, что значение $k_{\text{ОПЭ}}$ почти не зависит от pH, см.

Таблицу 3.2, при этом значение k_S увеличивается при снижении pH от 7.4 до 3.1 в 4 раза, что связано с повышенной реакционной способностью протонированной формы $O_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} (pKa 4.88), по отношению к HEWL-Trp $^{\cdot}$ и HEWL-TrpO $^{\cdot}$.

Таблица 3.2. Значения констант скорости $k_{OP\bar{E}}$ и k_S при различных значениях pH.

pH	$k_{OP\bar{E}} / 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_S / 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
3.1	10.3 ± 2.1	3.5 ± 0.7
4.9	9.6 ± 1.9	2.9 ± 0.6
7.3	8.5 ± 1.7	0.9 ^[3]

Пробы, отобранные во время фотолиза раствора KNAH $^-$ и HEWL при pH 3.1, 4.9 и 7.4, были далее проанализированы различными методами.

Анализ продуктов фотолиза HEWL с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле показал, что образование межмолекулярных кросс-сшивок HEWL наиболее выражено при pH 7.2 и демонстрирует резкое снижение выхода при pH < 7. Квантовые выходы димеров, $\Phi_{dim}(HEWL)$, полученные с помощью денситометрического анализа гелей, приведены в Таблице 3.1.

ВЭЖХ-УФ-МС анализ целого белка показал, что деградация HEWL практически не зависит от pH, см. Рис. 3.1 (А); значения $\Phi_{deg}(HEWL)$, рассчитанные по этим данным, приведены в Таблице 3.1. На Рис. 3.1 (Б) представлены суммарные изменения в количествах некоторых продуктов модификации HEWL, накопленные в процессе УФ-А-облучения.

Локализация модификаций HEWL была выполнена при ВЭЖХ-МС/МС анализе пептидов HEWL, полученных с помощью ферментативного расщепления белка ферментом трипсином. Было обнаружено, что при всех значениях pH значительная степень деградации HEWL обусловлена окисгенированием остатка W108 (W = TrpH в однобуквенном обозначении) с увеличением количества W108(+O) при снижении pH от 7.4 до 4.9, см Рис. 3.2 (А). Окисгенирование остатка W62 становится существенным только при снижении pH до 3.1.

Механизм окисгенирования W108 включает окисление остатка W108 в его реакции с $^3KNAH^-$ с образованием W108 $^{\cdot}$ и последующую реакцию W108 $^{\cdot}$ с $O_2^{\cdot-}$, реакция (3.6). Следует отметить, что W108 располагается в глубине отрицательно заряженного ферментативного центра HEWL. Предполагается, что увеличение окисгенирования W108 может быть связано с исчезновением кулоновского отталкивания между ферментативным центром и $^3KNAH^-/O_2^{\cdot-}$ при протонировании последних в кислой среде (pKa(3KNAH_2) = 3.7 [2] и pKa(HO_2^{\cdot}) = 4.88), что может способствовать проникновению данных частиц в активный центр HEWL.

Подтверждение повышенной реакционной способности HO_2^\bullet по сравнению с $\text{O}_2^{\bullet-}$ было показано в настоящей работе при аппроксимации кинетических кривых гибели HEWL-Trp^{*}, см. Таблицу 3.2.

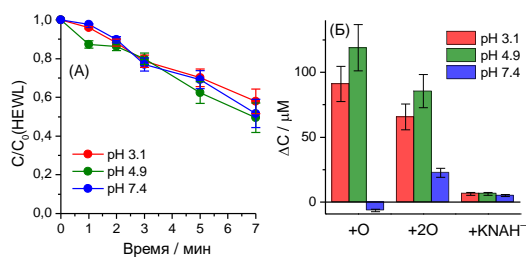


Рис. 3.1. (А) Зависимость концентрации HEWL относительно начального значения (C_0) от времени УФ-А фотолиза. (Б) Изменения концентраций модификаций HEWL в процессе УФ-А фотолиза.

Снижение pH раствора от 7 до 3 уменьшает количество пептидов с ковалентным присоединением KNAH^- в два раза, см. Рис. 3.2 (Б). Данный факт не согласуется с небольшим увеличением сигнала от HEWL- KNAH^- , наблюдаемым при анализе целого белка (Рис. 3.1 (Б)), что может указывать на увеличение разнообразия вариантов присоединения KNAH^- к различным остаткам TrpH и TyrOH при низких значениях pH. Регистрация МС/МС спектров данных модификаций выявила ранее неизвестную особенность их фрагментации – потерю CO_2 -группы фрагментом KNAH^- . В дальнейшем данная находка может помочь в поиске данной модификации в составе белков возрастных и катарактальных хрусталиков.

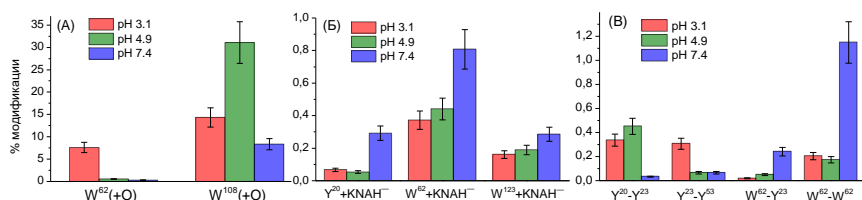


Рис. 3.2. Изменения содержания модифицированных пептидов HEWL относительно их начального количества в необлученном образце. (А) Однократно оксигенированные формы HEWL, (Б) ковалентное присоединение KNAH^- к HEWL и (В) кросс-сшивки HEWL.

Снижение pH раствора значительно снижает выход W62-содержащих кросс-сшивок и одновременно увеличивает выход Y-содержащих кросс-сшивок ($Y = \text{TyrOH}$ в однобуквенном обозначении), см. Рис. 3.2 (В). Учитывая результаты гель-электрофореза, можно предположить, что межмолекулярные кросс-сшивки преимущественно образуются между остатками W62, а сшивки по остаткам TyrOH характерны для внутримолекулярных связей. Причин увеличения выхода TyrOH-содержащих кросс-сшивок может быть несколько. Например, снижение

скорости конкурирующей бимолекулярной димеризации HEWL-Trp* по мере снижения pH, а также известного из литературы увеличения скорости внутримолекулярного переноса электрона от остатка TyrOH к TrpH⁺ по мере протонирования Trp*, реакция (3.8):



Таким образом, результаты фотолиза HEWL демонстрируют существенное влияние белковой глобулы на исход радикальных реакций между KNAH⁻ и TrpH/TyrOH. Во-первых, стоит отметить, что в случае белка изменение pH оказывает незначительное влияние на значение K_{опэ} при частичном протонировании HEWL-Trp* при pH 3.1, хотя выводы Раздела 2 давали основание предполагать увеличение K_{опэ} при условиях низких pH. По-видимому, ускорение ОПЭ к TrpH⁺ в случае белка нивелируется влиянием других pH-индуцированных изменений, например, изменением кулоновских взаимодействий между заряженными реагентами. Во-вторых, было показано, что снижение pH от 7.2 до 4.9 приводит к смене основного пути деградации HEWL с межмолекулярной димеризации на образование внутримолекулярных модификаций с доминированием оксигенирования остатков TrpH. Наблюдаемое резкое изменение может быть обусловлено двумя явлениями: (1) предположительным замедлением димеризации HEWL, реакция (3.7), по мере повышения положительного заряда глобулы HEWL в кислой среде и (2) повышенной реакционной способностью HO₂* по сравнению с O₂*⁻. Последнее предположение было подтверждено в настоящей работе с помощью анализа кинетики гибели радикалов. Таким образом, в случае белка pH-чувствительность значений k_s и k_d и высокая конкуренция оксигенирования и димеризации за центры Trp* в составе HEWL приводит к крайне высокой pH-чувствительности состава продуктов повреждения HEWL.

4. Диспропорционирование и димеризация кинуреновой кислоты под действием УФ-А излучения

Преыдушие исследования показали, что KNAH⁻-фотосенсибилизированный фотолиз TrpH и TrpH-содержащих белков приводит к ковалентному присоединению KNAH⁻ к TrpH с брутто-формулой нейтрально заряженного продукта KNAH-Trp. Предполагается, что в случае образования KNAH-Trp в составе белков хрусталика *in vivo*, эти модификации будут проявлять значительные фотосенсибилизирующие свойства, ускоряя накопление необратимых повреждений под действием УФ-А излучения. Установление механизма образования KNAH-Trp может помочь в оценке возможности образования данных продуктов *in vivo*, а также в выделении данных соединений в количествах, достаточных для дальнейшего исследования их фотохимических свойств.

Было высказано предположение, что источником KNAH-Тгр может быть реакция между Тгр[•] и радикалом KNA^{•-}, структура которого соответствует потере одного атома Н молекулой KNAH⁻. В настоящей работе было показано, что источником KNA^{•-} является реакция диспропорционирования между ³KNAH⁻ и основным состоянием KNAH⁻, реакция (4.1):



Скорость гибели ³KNAH⁻ увеличивается с увеличением концентрации KNAH⁻, см. Рис. 4.1 (А).

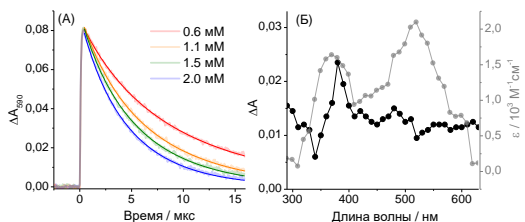


Рис. 4.1. (А) Кинетические кривые гибели ³KNAH⁻ при различных С(KNAH⁻). (Б) Спектр поглощения KNA^{•-} (черный цвет) и KNAH₂^{•-} (серый цвет).

Линейная аппроксимация зависимости псевдомолекулярной константы скорости гибели ³KNAH⁻ от С(KNAH⁻) дала значение $k_q = (6.0 \pm 1.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ для небуферного водного раствора. Низкое значение k_q указывает на кинетический контроль реакции (4.1). Величина k_q намного ниже константы скорости триплет-триплетной аннигиляции ³KNAH⁻, что объясняет отсутствие сообщений о реакции диспропорционирования в предыдущих работах. Значение КИЭ для k_q составило 3.5, что указывает на протекание реакции (4.1) по механизму переноса атома водорода.

Низкое значение $\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^-)$, $1.7 \pm 0.3 \%$, при лазерном импульсном облучении раствора KNAH⁻ в анаэробных условиях свидетельствуют о высокой эффективности рекомбинации между KNAH₂^{•-} и KNA^{•-} с восстановлением основного состояния KNAH⁻. Основными продуктами фотолиза KNAH⁻ являются пять димеров с m/z 377.1 $[\text{M}+\text{H}^+]^+$. Брутто-формула димеров свидетельствует об образовании данных продуктов в реакции соединения двух частиц KNA^{•-}.

Обнаруженная способность нового радикала вступать в реакцию димеризации даёт основания для предположения аналогичного механизма образования сшивок KNAH-Тгр в реакции между KNA^{•-} и Тгр[•]. Данный механизм образования KNAH-Тгр также согласуется с низким квантовым выходом KNAH-Тгр в случае свободных аминокислот и повышенным – в случае белков. В последнем случае, выход KNA^{•-} повышен вследствие медленной конкурирующей реакции ³KNAH⁻ с белком по сравнению со случаем реакции ³KNAH⁻ со свободной аминокислотой.

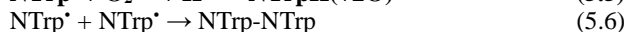
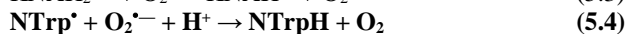
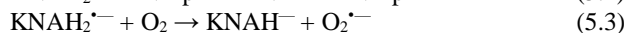
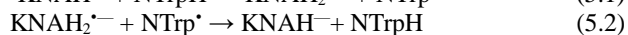
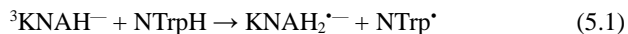
Из-за низкого содержания KNAH⁻ в хрусталике глаза (1–2 мкМ/мг) фотоиндуцированное диспропорционирование является крайне

маловероятным процессом. Однако следует отметить, что полученный в настоящей работе спектр промежуточного поглощения $\text{KNA}^{\bullet-}$, Рис. 4.1 (Б), схож со спектром продукта реакции между KNAH^- и гидроксильным радикалом, HO^\bullet [4]. Способность KNAH^- дезактивировать HO^\bullet , о которой сообщалось в ранних работах, свидетельствует об антиоксидантной активности KNAH^- . Таким образом, не исключается, что $\text{KNA}^{\bullet-}$ может участвовать в механизме антиоксидантной активности KNAH^- и иметь не фотохимическое происхождение *in vivo*.

5. Механизм и продукты реакции между радикалом триптофана и супероксид-анионом

Несмотря на биологическую значимость быстрой реакции между Trp^\bullet и $\text{O}_2^{\bullet-}$, информация о её механизме, приведённая в литературе, противоречива. Различные исследования оценивают выход необратимого оксигенирования TrpH в данной реакции на уровне 5 или 100 %. В настоящей работе для исследования данной реакции была использована способность $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ вступать в реакцию с O_2 с образованием $\text{O}_2^{\bullet-}$, показанная в предыдущих работах. Учитывая биологическую распространённость KNAH^- , данное вещество может вносить вклад в образование $\text{O}_2^{\bullet-}$ и АФК в наружных тканях, подвергающихся солнечному УФ-А излучению. Особую важность фотохимическое образование $\text{O}_2^{\bullet-}$ имеет для ткани хрусталика глаза, клетки которого лишены митохондрий, основных источников $\text{O}_2^{\bullet-}$ в живых клетках.

Основным преимуществом подхода настоящей работы является непосредственная регистрация не только кинетики гибели Trp^\bullet , но и кинетики восстановления реагентов, TrpH и KNAH^- , что не было исследовано в предшествующих работах. Первоначально предполагаемая схема радикальных реакций была следующей (в качестве производного триптофана был использован NTrpH):



Константа скорости реакции между Trp^\bullet и $\text{O}_2^{\bullet-}$, $k_s = 1.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, известная из литературы, соответствует двум потенциальным каналам, реакции (5.4) и (5.5). Для быстрого образования $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($\tau_{\text{эфф}} < 1 \text{ мкс}$) в реакции (5.3) образец был насыщен кислородом путем постоянной продувки (барботированием) чистого O_2 через водный раствор, что дало максимально возможную концентрацию $C(\text{O}_2) = 1.4 \text{ мМ}$.

Эволюция спектра ТА смеси 0.3 мМ KNAH^- и 2 мМ NTrpH в аэробных условиях приведена на Рис. 5.1 (А).

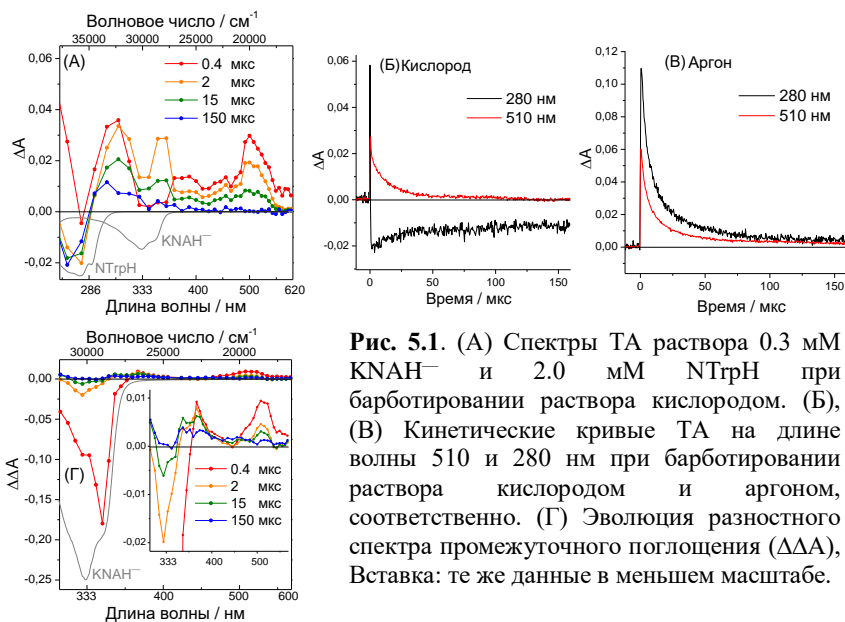


Рис. 5.1. (А) Спектры ТА раствора 0.3 мМ KNAH^- и 2.0 мМ NTGrH при барботировании раствора кислородом. (Б), (В) Кинетические кривые ТА на длине волны 510 и 280 нм при барботировании раствора кислородом и аргоном, соответственно. (Г) Эволюция разностного спектра промежуточного поглощения ($\Delta\Delta A$), Вставка: те же данные в меньшем масштабе.

Кинетика гибели частиц показывает, что исчезновение NTGr^\bullet не приводит к восстановлению основного состояния NTGrH , см. Рис. 5.1 (Б); ТА кривые на длинах волн 280 и 510 нм соответствуют максимумам поглощения NTGrH и NTGr^\bullet , соответственно. Для сравнения, кинетические кривые ТА для того же раствора были зарегистрированы в анаэробных условиях, при которых $\text{O}_2^{\bullet-}$ отсутствовал в растворе, Рис. 5.1 (В). В анаэробных условиях гибель NTGr^\bullet не приводит к выгоранию NTGrH , что согласуется с высокой эффективностью восстановления NTGrH в реакции (5.2), обнаруженной ранее (Раздел 2). Таким образом, сравнение двух условий напрямую указывает на высокий выход продуктов повреждения NTGrH в случае присутствия $\text{O}_2^{\bullet-}$ в смеси, т.е. на доминирование реакции (5.5) над реакцией (5.4) в реакции между NTGr^\bullet и $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Разностный спектр ТА, полученный при вычитании спектра поглощения радикала Trp^\bullet из наблюдаемого спектра ТА при аэробных условиях, Рис. 5.1 (Г), показал, что полное восстановление KNAH^- не достигается даже спустя десятки микросекунд. Данный факт указывает на неполное протекание реакции (5.3) с образованием KNAH^- и $\text{O}_2^{\bullet-}$, т.е. на существование альтернативного канала реакции между $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ и O_2 . Таким образом, образование $\text{O}_2^{\bullet-}$ при KNAH^- -сенситивизированном фотоллизе TrpH происходит менее эффективно, чем предполагалось ранее.

Недостаток $\text{O}_2^{\bullet-}$ в смеси также был подтвержден расчетами кинетической кривой гибели Trp^\bullet в рамках схемы реакций (5.1)-(5.6).

Оказалось, что экспериментально наблюдаемая гибель радикала Trp^{\bullet} протекает намного медленнее расчётной. Последний факт также указывает, что частицы, образующиеся в альтернативной реакции между $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$ и O_2 , обладают малой реакционной активностью по отношению к Trp^{\bullet} по сравнению с $\text{O}_2^{\bullet-}$, т.е. реагируют с Trp^{\bullet} с $k < 1.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Выход дегградации NTrpH в радикальных реакциях, $F_{\text{deg}}(\text{NTrpH})$, был рассчитан как $N_{\text{deg}}(\text{NTrpH})/N_0(\text{NTrp}^{\bullet})$, где $N_{\text{deg}}(\text{NTrpH})$ – количество поврежденных молекул NTrpH , а $N_0(\text{NTrp}^{\bullet})$ – количество NTrp^{\bullet} , образованных за время фотолиза. Высокое значение $F_{\text{deg}}(\text{NTrpH})$, см. Таблицу 7.1, свидетельствует о значительном вкладе реакции (5.5) в образование продуктов NTrpH . Однако следует отметить, что полученные значения $F_{\text{deg}}(\text{NTrpH})$ всё же не достигают 100 %, что указывает на наличие канала восстановления NTrpH в реакциях NTrp^{\bullet} , см. значения $F_{\text{восст}}(\text{NTrpH})$ в Таблице 7.1.

Таблица 7.1. Экспериментальные и расчетные значения $F_{\text{deg}}(\text{NTrpH})$, $F_{\text{восст}}(\text{NTrpH})$, $F(\text{NTrpH}(+\text{O}/2\text{O}))$ и $F(\text{diNTrpH})$ при УФ-А облучении раствора KNAH^- и NTrpH (355 нм, 3 мДж, 10 Гц).

	$F_{\text{deg}}(\text{NTrpH})$ / %	$F_{\text{восст}}(\text{NTrpH})$ / %	$F(\text{NTrpH}(+\text{O}/2\text{O}))$ / %	$F(\text{diNTrpH})$ / %
Эксп.	77 ± 15	23 ± 5	62 ± 12	15 ± 3
Расчет	82	18	52	30

Хроматограмма смеси KNAH^- и NTrpH до и после УФ-А фотолиза приведена на Рис. 5.2 (А). Основными продуктами NTrpH являются оксигенированные формы: N-ацетил-3 α -гидропероксипирролоиндол (NHPPi) и N-ацетил-N-формилкинууренин (NNFK), соответствующие присоединению двух атомов O, $\text{NTrpH}(+2\text{O})$, а также небольшое количество форм $\text{NTrpH}(+\text{O})$, например, N-ацетил-2-карбокси-3 α -гидроксипирролоиндол (NNHPI). Суммарный выход оксигенированных форм NTrpH в радикальных реакциях, $F(\text{NTrpH}(+\text{O}/2\text{O}))$, приведен в Таблице 7.1. Димеры NTrpH представлены шестью формами, ранее обнаруженными среди продуктов анаэробного фотолиза NTrpH , см. суммарное значение $F(\text{diNTrpH})$ в Таблице 7.1. ВЭЖХ-УФ-МС анализ также выявил множество оксигенированных димеров NTrpH , однако их низкие концентрации не позволяют провести количественную оценку. Качественный и количественный состав обнаруженных продуктов NTrpH , практически не зависит от $C(\text{O}_2)$, $C(\text{NTrpH})$ и $C_0(\text{NTrp}^{\bullet})$. Процентное содержание продуктов, полученных при различных значениях $C(\text{O}_2)$, приведено на Рис. 5.2 (Б).

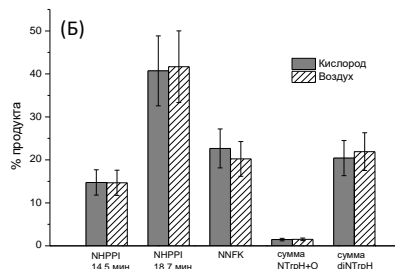
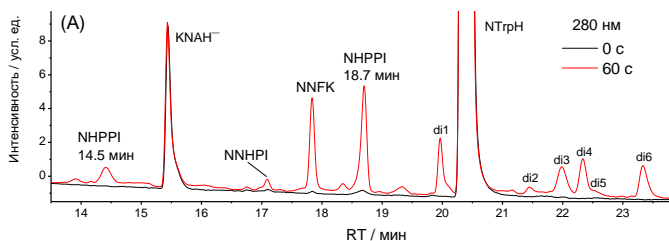
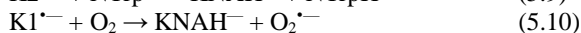
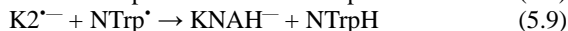
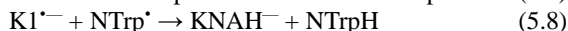
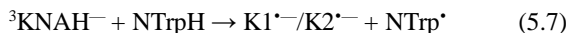


Рис. 5.2. (А) Хроматограмма продуктов фотолиза до (0 с) и после (60 с) УФ-А фотолиза (355 нм, 3 мДж) раствора 0.3 мМ KNAH^- и 10.0 мМ NTrpH при барботировании раствора кислородом. (Б) Процент продуктов NTrpH среди общего количества распавшегося NTrpH после 15 с УФ-А фотолиза при барботировании раствора кислородом или воздухом.

Канал гибели радикалов кинуреновой кислоты, альтернативный реакции 5.3, замедленная скорость гибели NTrp^{\bullet} и частичное восстановление NTrpH в радикальных реакциях, могут быть описаны в рамках следующей кинетической схемы:



где $\text{K1}^{\bullet-}$ и $\text{K2}^{\bullet-}$ представляют собой две формы $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$, обладающие разными химическими свойствами по отношению к O_2 , реакции (5.10) и (5.11f). Реакция между NTrp^{\bullet} и $\text{O}_2^{\bullet-}$, (5.4) и (5.5), и димеризация NTrp^{\bullet} (5.6) остаются в новой схеме без изменений. Предполагается, что в основе различия химических свойств $\text{K1}^{\bullet-}$ и $\text{K2}^{\bullet-}$ лежит существование двух таутомеров $\text{KNAH}_2^{\bullet-}$, которые ранее были обнаружены с помощью метода химической поляризации ядер с временным разрешением [5]. Обратимая реакция $\text{K2}^{\bullet-}$ с O_2 , приводящая к образованию пероксильного радикала, $\text{K2OO}^{\bullet-}$, реакция (5.11f), объясняет обнаруженное неполное восстановление KNAH^- и недостаток $\text{O}_2^{\bullet-}$. Обратимость данного процесса обуславливает присутствие $\text{K2}^{\bullet-}$, что, в свою очередь, приводит к частичному восстановлению NTrpH в реакции (5.9). Низкая константа скорости реакции между NTrp^{\bullet} и $\text{K2OO}^{\bullet-}$, реакция (5.12), объясняет медленную скорость реакции гибели NTrp^{\bullet} .

Аппроксимация кинетических кривых ТА в рамках предложенной схемы дала соотношение начальных количеств $K1^{*-}$ и $K1^{*-}$ на уровне 1:1. Значения остальных искомым параметров составили: $\varepsilon_{510}(K2^{*-}) = \varepsilon_{510}(K1^{*-}) = 2400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $k(5.11f) = 1.8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k(5.11b) = 5.4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ и $k(5.12) = 3.3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Кроме того, применение предложенной схемы к кинетическим кривым ТА на 390 нм показало присутствие неизвестного интермедиата с накоплением в бимолекулярных реакциях NTrp^* и мономолекулярной гибелью с константой скорости $4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. Вероятно, обнаруженный интермедиат является непосредственным продуктом реакции между NTrp^* и O_2^{*-} , С3-гидропероксидом N-ацетил-триптофана. Предположение об образовании данного интермедиата было высказано ранее в других работах, однако прямых свидетельств его существования предоставлено не было. Важно отметить, что образование нестабильного С3-гидропероксида триптофана также предполагается для биологически важной реакции $\text{TrpH} + {}^1\text{O}_2$. Таким образом, результаты настоящей работы, возможно, являются первым свидетельством существования данного интермедиата.

На основе предложенной кинетической схемы также были рассчитаны вклады реакций (5.4)-(5.6), (5.8), (5.9), и (5.12) в гибель NTrp^* . Было показано, что хорошее согласие между экспериментальными и расчётными выходами образования продуктов может быть достигнуто в предположении 100%-го выхода оксигенированных форм в реакции между NTrp^* и O_2^{*-} , см. Таблицу 7.1. Таким образом, как кинетика основного состояния NTrpH на микросекундной шкале, так и анализ стабильных продуктов NTrpH свидетельствуют о том, что реакция между NTrp^* и O_2^{*-} протекает с выходом оксигенированных форм NTrpH , близким к 100 %, что делает данную реакцию опасным источником повреждения TrpH *in vivo*.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1) Реакция между ${}^3\text{KNAH}^-$ и TrpH протекает по механизму последовательного переноса электрона и протона от TrpH к ${}^3\text{KNAH}^-$ с образованием радикалов KNAH_2^{*-} и Trp^* .

2) (А) Уменьшение pH водной среды от 7 до 3 приводит к снижению степени фотоиндуцированного повреждения свободного TrpH без изменений в составе образующихся продуктов. Это обусловлено увеличением константы скорости обратного переноса электрона от KNAH_2^{*-} к радикалу триптофана с восстановлением исходных реагентов. В свою очередь, ускорение обратного переноса электрона связано с образованием протонированного радикала, TrpH^+ , который является более сильным окислителем по сравнению с нейтральным радикалом Trp^* .

(Б) Степень повреждения белка HEWL не меняется в широком диапазоне pH 3–7 и не зависит от кислотно-основного равновесия

Трр^{*}/Трр⁺ в составе HEWL. Однако снижение pH от 7 до 5 существенно меняет характер основного повреждения остатков ТррН с кросс-сшивания на ковалентное присоединение кислорода (оксигенирование), что обусловлено сильной pH-зависимостью констант скорости и высокой конкуренцией реакций димеризации и оксигенирования за радикальные центры Трр^{*} в составе HEWL.

3) Реакция фотоиндуцированного диспропорционирования КНАН⁻ протекает по механизму переноса атома Н от основного состояния КНАН⁻ к ³КНАН⁻ с образованием ранее неизвестного радикала КНА^{•-}, способного вступать в реакцию ковалентного присоединения с другими радикалами КНА^{•-} с образованием димерных продуктов.

4) Реакция между Трр^{*} и O₂⁻ протекает с выходом оксигенированных форм ТррН, близким к 100%, что делает данную реакцию опасным источником повреждения ТррН. Также было обнаружено, что КНАН⁻ является менее эффективным фотохимическим генератором O₂⁻, нежели это предполагалось ранее.

Публикации автора по теме диссертации

1) **Zhuravleva Y.S.**, Morozova O.B., Tsentalovich Y.P., Sherin P.S. Proton-coupled electron transfer as the mechanism of reaction between triplet state of kynurenic acid and tryptophan // J. Photochem. Photobiol.A: Chem. – 2020. – Vol. 396. – P. 1-6. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2020.112522.

2) **Zhuravleva Y.S.**, Sherin P.S. Influence of pH on radical reactions between kynurenic acid and amino acids tryptophan and tyrosine. Part I. Amino acids in free state // Free Rad. Biol. Med. – 2021. – Vol. 172. – P. 331-3396. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.015.

3) **Zhuravleva Y.S.**, Sherin P.S. Influence of pH on radical reactions between kynurenic acid and amino acids tryptophan and tyrosine. Part II. Amino acids within the protein globule of lysozyme // Free Rad. Biol. Med. – 2021. – Vol. 174. – P. 211-224. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.001.

4) Morozova O.B., **Zhuravleva Y.S.**, Geniman M.P., Yurkovskaya A.V., Sherin P.S. Disproportionation and dimerisation of kynurenic acid under UV light // J. Photochem. Photobiol.A: Chem. – 2023. – Vol. 445. – P. 445. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2023.115009.

Тезисы докладов автора по теме диссертации

1) **Zhuravleva Y.S.**, Sherin P.S. Effect of pH on photoinduced radical reactions between amino acids and chromophores of human eye lens, Book of Abstracts 17th Congress of the International Union of Photobiology, г. Барселона, Испания, 25-30 августа 2019 г. Устный доклад.

2) **Zhuravleva Y.S.**, Sherin P.S. Effect of pH on radical reactions of tryptophan and lysozyme photosensitized by kynurenic acid, Сборник тезисов XI Международной конференции для молодых ученых по химии Mendeleev 2019, г. Санкт-Петербург, Россия, 9-13 сентября 2019 г. Устный доклад.

- 3) **Zhuravleva Y.S.**, Sherin P.S. Mechanisms of photoinduced reactions between kynurenic acid and tryptophan, Book of Abstracts Central European Conference on Photochemistry (CECP), г. Бад Хофгаштайн, Австрия, 9-13 февраля 2020. Устный доклад.
- 4) **Журавлева Ю.С.**, Шерин П.С. Влияние pH среды на механизмы фотоповреждения остатков триптофана и тирозина в составе белка лизоцима, Сборник тезисов XXXIII Симпозиума «Современная химическая физика», г. Туапсе, Россия, 24 сентября-4 октября 2021 г. Устный доклад.
- 5) **Zhuravleva Y.S.**, Sherin P.S. Effect of pH on Mechanisms and Products of Photodamage to Tryptophan and Tyrosine Residues in the Free State and a Model Protein, Book of Abstracts X International Voevodsky Conference “Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes”, г. Новосибирск, Россия, 5-9 сентября 2022 г. Устный доклад.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- [1] **Posener M.L.** Mechanism of tryptophan oxidation by some inorganic radical-anions: a pulse radiolysis study / M.L. Posener, G.E. Adams, P. Wardman, R.B. Cundall // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. – 1976. – Vol. 72, № 0. – P. 2231.
- [2] **Zhuravleva Y.S.** Acid-alkaline properties of triplet state and radical of kynurenic acid / Y.S. Zhuravleva, Y.P. Tsentalovich // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2018. – Vol. 365. – P. 7–12.
- [3] **Santus R.** Interactions of superoxide anion with enzyme radicals: Kinetics of reaction with lysozyme tryptophan radicals and corresponding effects on tyrosine electron transfer / R. Santus, L.K. Patterson, G.L. Hug, M. Bazin, J.C. Mazière, P. Morlière // Free Radical Research. – 2000. – Vol. 33, № 4. – P. 383–391.
- [4] **Prasanthkumar K.P.** A combined experimental and DFT approach on free radical induced oxidations of kynurenic acid / K.P. Prasanthkumar, P.K. Sajith, B.G. Singh // New J. Chem. – 2020. – Vol. 44, № 43. – P. 18858–18866.
- [5] **Morozova O.B.** Kynurenic acid and its chromophoric core 4-hydroxyquinoline react with tryptophan via proton-coupled electron transfer, and with tyrosine via H-transfer / O.B. Morozova, A.V. Yurkovskaya, P.S. Sherin // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2021. – Vol. 23, № 39. – P. 22483–22491.