

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ ИМ. В. В.  
ВОЕВОДСКОГО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК

На правах рукописи

Тимошников Виктор Александрович  
**АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
ДЕФЕРИПРОНА В РЕАКЦИЯХ С УЧАСТИЕМ ПЕРЕХОДНЫХ  
МЕТАЛЛОВ**

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
физико-математических наук

Научный руководитель:  
Доктор химических наук  
Поляков Николай Эдуардович

Новосибирск – 2024

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Список сокращений .....	16
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	17
1.1. Биологическая роль переходных ионов металлов .....	17
1.1.1. Функции железа и меди, а также их патологическая активность.....	17
1.1.2. Окислительно-восстановительные реакции с участием ионов железа и меди в гомогенных растворах.....	18
1.1.3. Окислительно-восстановительные реакции с участием ионов железа и меди в гетерогенных растворах.....	20
1.2. Антиоксидантные механизмы организма. Редокс активность аскорбиновой кислоты.....	23
1.3. Хелаторы ионов металлов.....	26
1.3.1. Координационные соединения.....	26
1.3.2. Влияние хелаторов на окислительно-восстановительные процессы с участием ионов переходных металлов.....	27
1.3.3. Фотохимическая активность хелаторов и их комплексов с участием ионов переходных металлов.....	29
1.3.4. Препараты-хелаторы ионов металлов, использующиеся для лечения заболеваний, связанных с избытком металлов в организме.....	31
1.3.5. Хелаторы группы гидроксипиридинов.....	33
1.3.6. Деферипрон.....	36
Выводы по литературному обзору и постановка задачи .....	37
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	39
2.1. Материалы и реактивы .....	39
2.2. Метод приготовления мицелл линолевой кислоты .....	39
2.3. Методы исследования.....	40
2.3.1. Ядерный магнитный резонанс.....	40

2.3.2. Химическая поляризация ядер.....	42
2.3.3. Электронный парамагнитный резонанс.....	45
2.3.3.1. Спиновые ловушки.....	46
2.3.3.2. Фотохимические исследования образования активных свободных радикалов.....	47
2.3.4. Метод оптической спектрофотометрии.....	48
2.3.5. Расчет констант равновесия и экстинкций хелатных комплексов....	49
2.3.5.1. Расчет комплексов 1:1 .....	49
2.3.5.2. Расчет комплексов 2:1 .....	51
2.3.5.3. Расчет комплексов 3:1 .....	52
2.3.6. Масс-спектрометрия.....	53
2.3.7. Измерение рН.....	53
<b>Глава 3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕФЕРИПРОНА С ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ .....</b>	<b>54</b>
3.1. Комплексообразование деферипрона с ионами диамагнитных металлов ...	54
3.2. Комплексообразование деферипрона с ионами меди .....	57
3.3. Заключение к главе.....	59
<b>Глава 4. ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕФЕРИПРОНА .....</b>	<b>60</b>
4.1. Фотодеградация деферипрона и его комплексов с ионами железа .....	60
4.2. Фотохимическая активность деферипрона в присутствии акцептора электрона.....	63
4.3. Фотохимическая активность деферипрона в присутствии донора электрона .....	68
4.4. Фотохимическая активность чистого деферипрона .....	74
4.5. Влияние диамагнитных металлов на фотоокисление деферипрона в реакциях с участием донора электрона.....	75
4.6. Заключение к главе.....	80
<b>Глава 5. ВЛИЯНИЕ ДЕФЕРИПРОНА НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ КИСЛОРОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ГОМОГЕННЫХ РАСТВОРАХ .....</b>	<b>81</b>

5.1. Влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в фотоиндуцированных реакциях с участием ионов железа .....	81
5.2. Влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в реакции Фентона с участием ионов железа.....	85
5.3. Влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в реакции Фентона с участием ионов меди.....	87
5.4. Влияние аскорбиновой кислоты на антиоксидантную активность деферипрона в реакции Фентона с участием ионов железа .....	91
5.5. Влияние аскорбиновой кислоты на антиоксидантную активность деферипрона в реакции Фентона с участием ионов меди .....	98
5.6. Заключение к главе.....	101
Глава 6. АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕФЕРИПРОНА В ОРГАНИЗОВАННЫХ СИСТЕМАХ.....	102
6.1. Антиоксидантная активность деферипрона в реакции перекисного окисления липидов. Сравнение с деферазироксом .....	102
6.2. Заключение к главе .....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	108
БЛАГОДАРНОСТИ .....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110

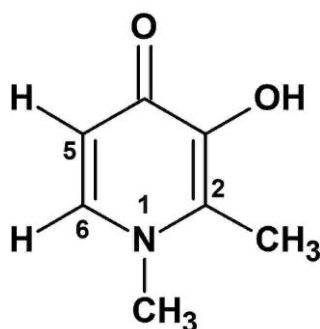
## ВВЕДЕНИЕ

Современные физико-химические методы, включающие методы ядерного магнитного резонанса, электронного парамагнитного резонанса, оптической спектрофотометрии и др., находят своё применение для решения широкого спектра междисциплинарных задач, связанных с биологией и медициной. Физико-химические параметры исследуемых соединений, включая константы равновесия реакций, экстинкции, структуры интермедиатов, константы сверхтонкого взаимодействия спиновых аддуктов и пр., являются основополагающей информацией понимания практического применения веществ в той или иной области биологии и медицины. Тема данной работы непосредственно связана с применением набора физико-химических методов для исследования свойств координационных комплексов металлов, применяющихся в медицине.

Ионы металлов являются важными элементами, входящими в состав многих белков, коферментов и витаминов. Данные частицы участвуют в различных процессах, таких как перенос кислорода/углекислого газа в тканях и клетках, синтез ДНК а также в работе энергетической системы клеток [1;2].

Тем не менее, существуют заболевания, например, талассемия, гемосидероз, гемохроматоз, болезнь Вильсона, связанные с нарушением вывода металлов из организма. В результате металлы способны накапливаться в различных тканях и органах, чаще всего в печени, почках, легких, сердце и мозге [3;4]. Свободные или слабозакомплексованные ионы переходных металлов способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях с образованием активных кислородных радикалов (АКР). Окисление липидов, денатурация белков, разрушение нуклеиновых последовательностей и пр. – результаты неконтролируемой генерации АКР [5]. Обычно организм может справиться с окислительным стрессом, например альфа-токоферол (витамин Е) вместе с аскорбиновой кислотой (витамин С) способны предотвращать окисление липидных мембран клеток [6]. Однако в случае ряда заболеваний организм неспособен ингибировать неконтролируемую генерацию АКР.

Для лечения данных заболеваний используют препараты-хелаторы. Данные вещества способны связываться с ионами металла и выводить их из организма. В настоящий момент в медицине для лечения заболеваний, связанных с избытком железа, используются хелаторы, способные образовывать стабильные комплексы с ионами металлов. К таким веществам относится деферипрон (1,2-диметил-3-гидрокси-4-пиридион, L1) (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Структура молекулы деферипрона (1,2-диметил-3-гидрокси-4-пиридион, L1).

Данное вещество используется в хелатотерапии для лечения заболеваний, связанных с накоплением железа в организме, таких как гемосидероз, гемохроматоз и др. Кроме того, L1 уменьшают окислительный стресс, вызванный избытком металлов [7]. Однако детальный молекулярный механизм их антиоксидантной активности в литературе описан не был.

Кроме того, недостаточно изучен физико-химический аспект взаимодействия препаратов-хелаторов и хелатных комплексов с хелаторами, вырабатываемыми и находящимися непосредственно в организме. В литературе описаны случаи образования смешанных хелатных комплексов, включающих в себя аскорбиновую кислоту [8;9]. Исследование взаимодействия препаратов-хелаторов и их хелатных комплексов с естественными хелаторами, а также изучение редокс активности смешанных комплексов позволит лучше понять механизм антиоксидантной активности лекарственных веществ.

Помимо этого, в литературе не были описаны фотохимические свойства L1, а также его комплексов с ионами металлов. При комплексообразовании молекулы с ионом Fe(III) появляется дополнительная полоса поглощения между 300 и 800 нм [10]. Этот свет может проникать через кожу и достигать капилляров [11].

Изучение фотохимической стабильности комплексов L1 с металлами особенно важно для пациентов, живущих в регионах с высокой солнечной активностью.

### **Актуальность темы исследования**

Существуют различные заболевания, связанные с избытком переходных металлов в организме, таких как железо и медь. Течение подобных заболеваний сопровождается неконтролируемой генерацией активных кислородных радикалов, способных окислять, повреждать и разрушать большинство биомолекул в организме, вызывая окислительный стресс. Помимо этого, окислительно-восстановительные процессы с участием ионов железа и меди являются важным элементом в работе многих жизненно важных систем организма, включая энергетическую, перенос кислорода, а также процессы воспаления и запрограммированной гибели клеток. Поэтому медики и ученые ищут эффективные и оптимальные инструменты для регулирования окислительно-восстановительных процессов, связанных с ионами металлов в организме.

Хелаторы – вещества, способные связываться с ионами металлов и выводить их из организма. Деферипрон, принадлежащий группе гидроксипиридинонов, является одним из самых эффективных препаратов для лечения заболеваний, связанных с избытком железа. Его отличительной особенностью является низкая токсичность, высокая водорастворимость и антиоксидантная активность, что позволяет применять этот препарат перорально и с меньшими терапевтическими дозами по сравнению с другими лекарствами той же направленности. Хотя эффективность хелатора подтверждена, точный механизм его антиоксидантного действия в окислительно-восстановительных реакциях с участием ионов железа остаётся неизвестным. Поэтому изучение антиоксидантных свойств деферипрона в реакциях с ионами переходных металлов в гомогенных и организованных средах актуально в различных областях координационной химии и медицины.

Еще одним немаловажным свойством, присущим многим хелатным комплексам является фототоксичность. В результате комплексообразования

фотохимические и фотофизические свойства закомплексованного лиганда меняются. Поэтому информация о фотохимической активности деферипрона и его хелатных комплексах с ионами металлов является актуальной с точки зрения хранения, транспортировки деферипрона и других препаратов группы гидроксипиридинов, а также его применения в регионах с высокой солнечной активностью.

### **Степень разработанности темы**

В настоящий момент фотохимия молекул группы гидроксипиридинов изучена крайне слабо. В работе для исследования фотохимической активности деферипрона применяется метод химической поляризации ядер (ХПЯ), который является мощным инструментом для изучения радикальных реакций, однако на данный момент подобная методика для изучения препаратов группы гидроксипиридинов не применялась. Помимо этого, в литературе описано, что деферипрон обладает антиоксидантной активностью, однако механизм действия не описан. Для изучения данного вопроса был использован комплексный методологический подход, включающий в себя оптическую спектрофотометрию, ЯМР и ЭПР спектроскопию со спиновыми ловушками. Кроме того, для полноценного исследования редокс активности деферипрона были взяты различные модельные системы, такие как реакция Фентона с ионами железа и меди в отсутствие и присутствии аскорбиновой кислоты, а также перекисное окисление мицелл линолевой кислоты.

### **Цели и задачи исследования**

Целью работы является исследование фотохимической, а также антиоксидантной активности деферипрона и его комплексов с ионами металлов с использованием различных физико-химических методов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Исследовать координационные свойства деферипрона и его хелатных комплексов с ионами переходных и непереходных металлов;
- Установить механизм фотохимического взаимодействия деферипрона и его комплексов с ионами металлов в реакциях переноса электрона;



— Исследовать антиоксидантные свойства деферипрона в окислительно-восстановительных реакциях с образованием активных кислородных радикалов с участием ионов переходных металлов в гомогенных растворах и организованных средах;

### **Научная новизна**

Рассчитаны константы равновесия, экстинкции и стехиометрии хелатных комплексов деферипрона с ионами меди, кальция, цинка и алюминия в различных условиях. Установлен механизм взаимодействия деферипрона с ионами Fe(II). Выявлены основные пути фотодегradации деферипрона в реакции с донорами и акцепторами электрона в отсутствии и присутствии ионов металлов. Определен механизм антиоксидантной активности деферипрона в темновых и фотоиндуцированных реакциях с участием ионов Fe и Cu в гомогенных и гетерогенных растворах. Исследовано взаимодействие хелатных комплексов деферипрона с аскорбиновой кислотой. Проведен сравнительный анализ влияния хелаторов деферипрона и деферазирокса на перекисное окисление липидов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Количественные и качественные данные, полученные по стехиометрии, константам равновесия и экстинкциям хелатных комплексов могут быть использованы в дальнейшем для изучения структур хелатных комплексов с участием пиридинпроизводных лигандов. Установленные механизмы фотодегradации, антиоксидантной активности деферипрона и его хелатных комплексов с ионами переходных металлов в гомогенных и гетерогенных растворах имеют как фундаментальное, так и прикладное значение: уточнение модели влияния антиоксидантных хелаторов на окислительные процессы в клетках, такие как ферроптоз, создание более эффективных лекарств для лечения заболеваний, связанных с избытком переходных металлов в организме. Кроме того, данные о взаимодействии аскорбиновой кислоты с ионами металлов и ее разложении в окислительно-восстановительных реакциях с участием ионов железа и меди также могут внести вклад в установление механизма действия витамина С в организме.

## Методология и методы исследования

В работе использовался ряд физико-химических методов, включающий в себя  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопию, спектрофотометрию в УФ и видимом диапазоне, ЭПР со спиновыми ловушками, масс-спектрометрию и химическую поляризацию ядер (ХПЯ), в том числе с временным разрешением (ВР-ХПЯ). Константы равновесия и экстинкции комплексов деферипрона с ионами металлов, а также эффективные константы скорости окисления аскорбиновой кислоты с участием ионов железа и меди в присутствии деферипрона были получены с использованием метода оптической спектрофотометрии.

## Положения, выносимые на защиту

1. Подход к расчетам констант равновесия, экстинкциях и стехиометрии комплексов деферипрона с ионами  $\text{Zn(II)}$ ,  $\text{Ca(II)}$ ,  $\text{Cu(II)}$  и  $\text{Al(III)}$  в различных средах на основании оптических спектров поглощения хелатных комплексов металлов.
2. Механизм радикальной фотохимической активности L1 в реакции с донорами и акцепторами электрона, а также структуры радикальных интермедиатов и основных продуктах деферипрона, основанные на данных ЯМР и ХПЯ.
3. Комплексный подход к изучению антиоксидантных свойств хелатных комплексов деферипрона с ионами железа и меди в гомогенных растворах с использованием методов оптической спектрофотометрии, ЯМР и ЭПР со спиновыми ловушками.
4. Наблюдаемые зависимости изменения ЭПР сигнала ОН спиновых аддуктов от соотношения концентраций деферипрон-ион металла как средство доказательства стерического фактора антиоксидантной активности деферипрона.
5. Влияние соотношения концентраций деферипрон-ион металла на окислительно-восстановительную активность аскорбиновой кислоты в реакции Фентона и Габера-Вейса.

6. Результаты сравнения эффективности деферипрона и деферазирокса в ингибировании реакции перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов Fe(III) и Cu(II).

### **Степень достоверности научных результатов**

Достоверность представленных в диссертационной работе результатов и заключений обусловлена использованием современных экспериментальных подходов, воспроизводимостью научных результатов и их согласием с литературными данными. Полученные результаты были продемонстрированы на российских и международных конференциях, а также опубликованы в высокорейтинговых журналах.

### **Апробация результатов**

Результаты, представленные в работе, были апробированы на следующих российских и международных конференциях:

- 1) **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E. UV light induced Photodegradation of Deferiprone Chelate Complexes. NMR and CIDNP Study // *Сборник статей XVII International Youth Scientific School «Actual problems of magnetic Resonance and its application»*, 2014. Казань, Россия. P. 150-153.
- 2) **Timoshnikov V. A.**, Selyutina O. Yu., Polyakov N. E. NMR and CIDNP Study of Phototransformation of Iron Chelator Deferiprone in the Presence of Metal Ions // *Сборник тезисов III International Youth Scientific School, “Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics”*, 2014. Новосибирск, Россия. P. 90.
- 3) **Тимошников В. А.** Исследование окислительно-восстановительных процессов с участием деферипрона и его комплексов с ионами металлов // *МНСК*, 2014. Новосибирск, Россия. P. 87.
- 4) **Тимошников В. А.**, Кобзева Т. В. Исследование ингибирования гидроксильных радикалов в реакциях, индуцированных ионами железа с участием деферипрона // *МНСК*, 2015. Новосибирск, Россия. P. 86.

- 5) **Тимошников В. А.**, Кобзева Т. В. Исследование ингибирования образования гидроксильных радикалов в реакциях, индуцированных ионами меди с участием деферипрона // *МНСК*, 2016. Новосибирск, Россия. P. 59.
- 6) **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Selyutina O.Yu., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Effective Inhibition of Copper Catalyzed Production of Reactive Oxygen Species by Deferiprone // *Proceedings of 2016 Mogan Mountain International Conference on Green Pharmaceuticals*, 2016. Deqing, China. P. 7-14.
- 7) **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. EPR spin trapping study of redox reactions of deferiprone chelating complexes // *IV Молодежная школа с международным участием «Магнитный резонанс и магнитные явления в химической и биологической физике»*, 2016. Новосибирск, Россия. P. 46.
- 8) **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Kobzeva T. V., Kontoghiorghes G. J. Influence of deferiprone on redox reactions with Fe and Cu ions // *The 26<sup>th</sup> International Conference on Chelation*, 2017. Paphos, Cyprus, P. 16.
- 9) **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Inhibition of copper and iron induced hydroxyl radical formation by metal chelator deferiprone // *2-nd Russian Conference on Medicinal Chemistry*, 2015, Новосибирск, Россия. P. 291.
- 10) **Timoshnikov V. A.**, Selyutina O. Yu., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Antioxidant and pro-oxidant activity of chelators in lipid membranes peroxidation // *V School for young scientists "Magnetic resonance and magnetic phenomena in chemical and biological physics"*, 2018. Санкт-Петербург, P. 50.
- 11) Selyutina O. Yu., **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E. The influence of chelators on lipid oxidation // *III International Conference "Spin physics, spin chemistry and spin technology (SPCT-2018)"*, 2018. Новосибирск, Россия. P. 119.
- 12) **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Investigation of photoinduced redox reactions involving deferiprone and its complexes with metal

ions // *III International Conference "Spin physics, spin chemistry and spin technology (SPCT-2018)"*, 2018. Новосибирск, Россия. P. 124.

- 13) **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Selyutina O. Yu., Kobzeva T. V., Kontoghiorghes G. J. Antioxidant and redox activity of deferiprone and its chelate complexes with iron and copper ion // *International Symposium on Metal Complexes (ISMEC-2018)*, 2018. Florence, Italy. P. 205-206.
- 14) **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Selyutina O. Yu., Kobzeva T. V., Kontoghiorghes G. J. Investigation of the effect of chelating compounds on lipid peroxidation induced by iron and copper ions // *International Conference Recent Advances in Health and Medical Sciences (10th RAHMS)*, 2019. Paphos, Cyprus. P. 27.
- 15) **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N. E., Selyutina O. Yu., Kontoghiorghes G. J. Investigation of Deferiprone Influence on Generation Oxygen Species in Redox Reactions with Iron and Copper Ions using EPR Spectroscopy with Spin Traps // *XXI Youth Scientific School: Actual problems of magnetic resonance and its application*, 2019. Казань, Россия. P. 199.
- 16) Selyutina O. Yu., **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E. The influence of chelators on lipid oxidation // *XXI Youth Scientific School: Actual problems of magnetic resonance and its application*, 2019. Казань, Россия. P. 195.

## Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК:

- 1) **Timoshnikov V.A.**, Klimentiev V.I., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Photoinduced transformation of iron chelator deferiprone: Possible implications in drug metabolism and toxicity // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2014. Vol. 289. P. 14–21. [Q2; IF = 4.3]
- 2) **Timoshnikov V.A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Inhibition of Fe<sup>2+</sup>- and Fe<sup>3+</sup>- induced hydroxyl radical production by the iron-chelating

- drug deferiprone // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 78. P. 118–122. [Q1; IF = 7.4]
- 3) **Timoshnikov V.A.**, Kobzeva T., Selyutina O.Y., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Effective inhibition of copper-catalyzed production of hydroxyl radicals by deferiprone // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2019. Vol. 24, № 3. P. 331–341. [Q2; IF = 2.6]
- 4) **Timoshnikov V.A.**, Kobzeva T.V., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Redox Interactions of Vitamin C and Iron: Inhibition of the Pro-Oxidant Activity by Deferiprone // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 11. P. 3967. [Q2; IF = 5.6]
- 5) Kontoghiorghes G.J., Kolnagou A., Kontoghiorghes C.N., Mourouzidis L., **Timoshnikov V.A.**, Polyakov N.E. Trying to Solve the Puzzle of the Interaction of Ascorbic Acid and Iron: Redox, Chelation and Therapeutic Implications // *Medicines*. 2020. Vol. 7. P. 45.
- 6) **Timoshnikov V.A.**, Kichigina L.A., Selyutina O.Yu., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Antioxidant Activity of Deferasirox and Its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 16. P. 5064. [Q2; IF = 4.6]
- 7) **Timoshnikov V.A.**, Selyutina O.Y., Polyakov N.E., Didichenko V., Kontoghiorghes G.J. Mechanistic Insights of Chelator Complexes with Essential Transition Metals: Antioxidant/Pro-Oxidant Activity and Applications in Medicine // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 3. P. 1247. [Q2; IF = 5.6]

Большая часть материалов диссертации изложено в опубликованных работах.

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

Работа соответствует пунктам 1 «экспериментальные методы исследования химической структуры и динамики химических превращений», 2 «структура и свойства вандерваальсовых молекул, комплексов, ридберговских молекул, кластеров, ассоциатов, пленок, адсорбционных слоев, интеркалятов, межфазных границ, мицелл, дефектов», 5 «химические механизмы реакций и управление

реакционной способностью» и 6 «строение, структура, и реакционная способность интермедиатов химических реакций» паспорта специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

### **Связь темы диссертации с плановыми исследованиями**

Работа выполнена в лаборатории магнитных явлений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук, в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук «Исследование молекулярных механизмов физико-химических и биологических процессов методами магнитного резонанса и спиновой химии» (номер государственной регистрации 224021500612-1) при поддержке гранта РФФИ: № 18-34-00343 «Исследование влияния соединений-хелаторов на перекисное окисление липидов, индуцированное ионами железа и меди методами химической радиоспектроскопии».

### **Личный вклад соискателя**

Практически все экспериментальные данные были либо получены лично, либо при непосредственном участии соискателя. Автор также участвовал в составлении плана исследований, обсуждении результатов, формулировке выводов и написании статей по теме диссертационной работы.

### **Объем и структура работы**

Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 37 рисунков, 18 схем и 7 таблиц. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, используемых в работе, экспериментальных результатов и их анализа, заключения, списка используемых сокращений, списка цитируемой литературы, состоящего из 190 пункта.

## Список сокращений

- AscH<sub>2</sub> – аскорбиновая кислота;
- OH<sup>•</sup> – гидроксильный радикал;
- OOH<sup>•</sup> – пероксильный радикал;
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – супероксид радикал;
- АКР – активные кислородные радикалы;
- AscH<sup>-</sup> анион аскорбиновой кислоты;
- Asc<sup>•-</sup> – анион радикал аскорбиновой кислоты;
- AscH<sup>•</sup> – радикал аскорбиновой кислоты;
- ДГА – дегидроаскорбат;
- L1 – деферипрон;
- DFRX – деферазирокс;
- Trp – N-ацетил-L-триптофан;
- ЛК – линолевая кислота;
- <sup>1</sup>O<sub>2</sub> – синглетный кислород;
- CH<sub>3</sub><sup>•</sup> – метильный радикал;
- OCH<sub>3</sub><sup>•</sup> – метоксильный радикал;
- DFO – дефероксамин;
- ГП – гидроксипиридиноны;
- ФБ – фосфатно-солевой буфер;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;
- ХПЯ – химическая поляризация ядер;



## Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Биологическая роль переходных ионов металлов

#### *1.1.1. Функции железа и меди, а также их патологическая активность*

Наиболее распространёнными металлами переменной валентности в живых системах являются железо и медь. Среди известных функций ионов железа можно выделить транспорт кислорода за счет молекул гемоглобина и миоглобина, участие в окислительно-восстановительных реакциях, синтез нуклеиновых последовательностей, иммунная функция и метаболизме витаминов группы В [2;12].

Патологии, связанные с дисбалансом железа можно разделить на две группы: недостаток железа и его избыток. Одним из наиболее распространенных заболеваний, связанных с недостатком железа, является железодефицитная анемия, от которой страдает порядка трети населения планеты [13]. В случае избытка железа можно выделить такие заболевания как талассемия, серповидно-клеточная анемия, гемохроматоз и др., связанные с отложением связанных ионов металлов в жизненно важных тканях и органах [14–16].

Медь наряду с железом необходимо организму для нормального функционирования. При гомеостазе медь выполняет ряд важных функций, таких как контроль работы множества ферментов (супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза и др.), регулирование уровня железа в организме, участие передачи нервных сигналов [17–20]. Тем не менее, аналогично железу, существуют патологии, связанные с ионом меди, например, болезнь Менке и болезнь Вильсона. В случае болезни Вильсона, увеличивается поглощение меди и уменьшается её выведение, что приводит к её накоплению, в основном в печени, приводящее к циррозу [21].

### 1.1.2. Окислительно-восстановительные реакции с участием ионов железа и меди в гомогенных растворах

Основной причиной токсичности железа и меди в организме является окислительный стресс, вызванный неконтролируемой генерацией активных кислородных радикалов (АКР) в окислительно-восстановительных реакциях с участием ионов металлов. Механизм генерации радикалов в гомогенных растворах подробно изучен различными физическими методами, и подробно описан в литературе. Основные взаимодействия с ионами железа и меди с образованием АКР описаны в реакциях (Уравнения 1-29, Таблица 1):

**Таблица 1** - Окислительно-восстановительные реакции с участием ионов железа и меди

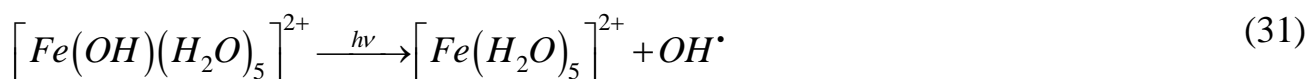
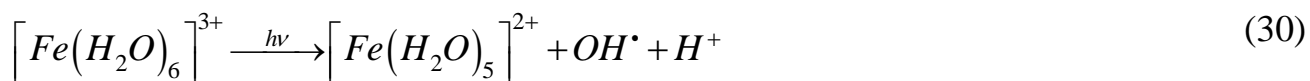
Реакция	Порядковый номер	ссылка
$Fe^{3+} + H_2O \xrightleftharpoons{K=2.9 \cdot 10^{-3} M} FeOH^{2+} + H^+$	(1)	[22]
$Fe^{3+} + 2H_2O \xrightleftharpoons{K=7.62 \cdot 10^{-7} M^2} Fe(OH)_2^+ + 2H^+$	(2)	[22]
$2Fe^{3+} + 2H_2O \xrightleftharpoons{K=0.8 \cdot 10^{-3} M} Fe_2(OH)_2^{4+} + 2H^+$	(3)	[23]
$Fe^{3+} + H_2O_2 \xrightleftharpoons{K=3.1 \cdot 10^{-3} M} Fe^{III}(HO_2)^{2+} + H^+$	(4)	[24]
$FeOH^{2+} + H_2O_2 \xrightleftharpoons{K=3.1 \cdot 10^{-3} M} Fe^{III}(OH)(HO_2)^+ + H^+$	(5)	[24]
$Fe^{III}(HO_2)^{2+} \xrightarrow{k=2.7 \cdot 10^{-3} c^{-1}} Fe^{2+} + OOH^{\bullet}$	(6)	[25]
$Fe^{III}(OH)(HO_2)^+ \xrightarrow{k=2.7 \cdot 10^{-3} c^{-1}} Fe^{2+} + OOH^{\bullet} + OH^-$	(7)	[25]
$Fe^{2+} + H_2O_2 \xrightarrow{k=63.0 M^{-1} c^{-1}} Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$	(8)	[26]
$Fe^{2+} + OH^{\bullet} \xrightarrow{k=3.2 \cdot 10^8 M^{-1} c^{-1}} Fe^{3+} + OH^-$	(9)	[27]
$OH^{\bullet} + H_2O_2 \xrightarrow{k=3.3 \cdot 10^7 M^{-1} c^{-1}} OOH^{\bullet} + H_2O$	(10)	[28]
$Fe^{2+} + OOH^{\bullet} \xrightarrow{k=1.2 \cdot 10^6 M^{-1} c^{-1}} Fe^{III}(HO_2)^{2+}$	(11)	[29]
$Fe^{2+} + O_2^{\bullet-} + H^+ \xrightarrow{k=1.0 \cdot 10^7 M^{-1} c^{-1}} Fe^{III}(HO_2)^{2+}$	(12)	[30]
$Fe^{3+} + OOH^{\bullet} \xrightarrow{k < 2 \cdot 10^3 M^{-1} c^{-1}} Fe^{2+} + O_2 + H^+$	(13)	[30]
$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{k=5 \cdot 10^7 M^{-1} c^{-1}} Fe^{2+} + O_2$	(14)	[31]

$OOH^{\bullet} \xrightarrow{k=1.58 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}} O_2^{\bullet-} + H^+$	(15)	[32]
$O_2^{\bullet-} + H^+ \xrightarrow{k=1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} OOH^{\bullet}$	(16)	[32]
$OOH^{\bullet} + OOH^{\bullet} \xrightarrow{k=8.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} H_2O_2 + O_2$	(17)	[32]
$OOH^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H_2O \xrightarrow{k=9.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-2} \text{ c}^{-1}} H_2O_2 + O_2 + OH^-$	(18)	[32]
$OH^{\bullet} + OOH^{\bullet} \xrightarrow{k=0.71 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} H_2O + O_2$	(19)	[33]
$OH^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{k=1.01 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} H_2O + O_2$	(20)	[33]
$OH^{\bullet} + OH^{\bullet} \xrightarrow{k=5.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} H_2O_2$	(21)	[33]
$Cu^+ + O_2 \xrightarrow{k=1.5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} Cu^{2+} + O_2^{\bullet-}$	(22)	[34]
$Cu^+ + O_2^{\bullet-} + H_2 \xrightarrow{k=1.98 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} Cu^{2+} + H_2O_2$	(23)	[35]
$Cu^+ + H_2O_2 \xrightarrow{k=61 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} Cu^{3+} + 2OH^-$	(24)*	[34]
$Cu^{2+} + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{k=6.6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} Cu^+ + O_2$	(25)	[35]
$Cu^{2+} + H_2O_2 \xrightarrow{k=460 \pm 9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} Cu^+ + OOH^{\bullet} + H^+$	(26)	[34]
$Cu^{3+} + Cu^+ \xrightarrow{k=3.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} 2Cu^{2+}$	(27)	[36]
$Cu^{3+} + H_2O_2 \xrightarrow{k < 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} Cu^{2+} + O_2^{\bullet-} + 2H^+$	(28)	[37]
$Cu^+ + H_2O_2 \xrightarrow{k=79 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}} Cu^{2+} + OH^- + OH^{\bullet}$	(29)	[38]

\*Константа скорости реакции может варьироваться в широком диапазоне ( $\sim 100-10,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) в зависимости от температуры, ионной силы, pH и содержания кислорода в растворе. Более подробно реакция (24) описана в [39].

Как видно из Таблицы 1, лимитирующими реакциями являются взаимодействия ионов железа и меди с перекисью водорода (Уравнения 4,6,8,24,26,28,29) (реакции Фентона и Габера-Вейса), в результате которых образуются гидроксильные ( $OH^{\bullet}$ ) и пероксильные ( $OOH^{\bullet}$ ) радикалы.

Помимо радикальных темновых реакций в растворе могут проходить фотоиндуцированные реакции с образованием АКР. Среди подобных реакций можно выделить фотоокисление аквакомплексов ионов железа с образованием  $OH^{\bullet}$  с высоким квантовым выходом (0.1-0.3) в зависимости от длины волны излучения и pH раствора [40;41] (Уравнения 30,31):



### ***1.1.3. Окислительно-восстановительные реакции с участием ионов железа и меди в гетерогенных растворах***

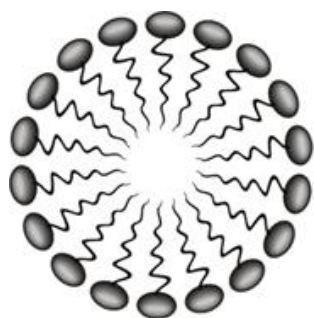
В отличие от обычных гомогенных растворов даже простейшие биологические системы представляют из себя многокомпонентные гетерогенные системы, включающие в себя множество различных молекул, способных участвовать в редокс реакциях, что значительно осложняет анализ химических взаимодействий, констант скоростей реакций, продуктов, интермедиатов и др.

Тем не менее, наблюдается повышенный интерес к изучению свободнорадикальных реакций в биологических системах и их роль в гомеостазе клетки, который продолжается уже более 40 лет [5;42;43]. Одним из последних прорывов в области свободнорадикальных процессов в биологических системах является открытие нового механизма запрограммированной смерти клетки – ферроптоза, редокс процессом с участием ионов железа [44;45]. Полученные к настоящему времени данные о ферроптозе позволили по-новому взглянуть на патогенез различных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера, атеросклероза, рака и др. [46–49].

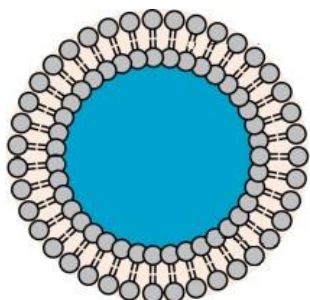
Несмотря на отсутствие полноценного понимания механизма действия ферроптоза, доподлинно известно, что одним из основных этапов данного типа гибели клетки является перекисное окисление клеточной мембраны с участием ионов железа, что ведет к нарушению гомеостаза, разрушению клеточной мембраны и, в конечном итоге, гибели клетки [50].

Для исследования окислительно-восстановительных процессов, происходящих с мембраной клеток в процессе ферроптоза используют различные модельные системы для изучения редокс реакций с участием липидов и ионов переходных металлов. Наиболее распространенными модельными системами для

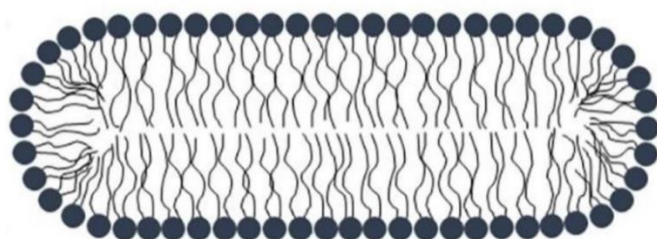
изучения перекисного окисления липидов являются мицеллы, бицеллы и липосомы (Рисунок 2) [51–53]:



А



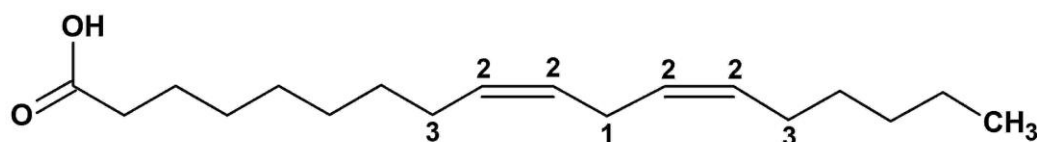
Б



В

**Рисунок 2.** Модельные системы для изучения процессов с участием липидных мембран: А мицелла; Б липосома; В бицелла [51–53].

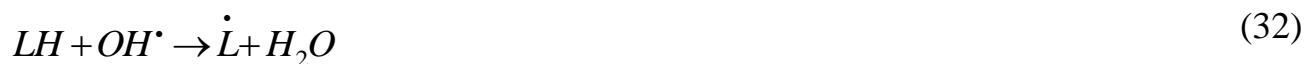
Мицеллы являются одними из самых изученных модельных систем по изучению различных процессов с участием липидных мембран, в том числе перекисного окисления [54]. Линолевая кислота (ЛК) является одной из самых хорошо изученных молекул в процессах перекисного окисления липидов, используемых в качестве вещества для создания мицелл (Рисунок 3).



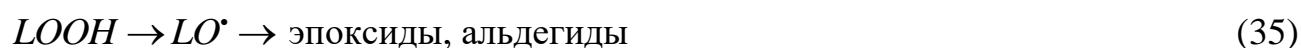
**Рисунок 3.** Химическая структура линолевой кислоты (ЛК). Номерами 1, 2, 3 помечены протоны при двойных связях, являющиеся наиболее вероятными местами атаки АКР.

ЛК является полиненасыщенной жирной кислотой, перекисное окисление которой подробно описано в литературе [54]. Инициировать перекисное

окисление способны АКР, например,  $\text{OH}^\bullet$ , образующийся в результате реакции переходных металлов с перекисью водорода (Уравнения 8,29). Основным центром взаимодействия АКР с ЛК являются протоны 1, 2 и 3, расположенные при двойных связях. В результате, на начальной стадии образуются радикалы ЛК и перекисные радикалы ЛК ( $\text{LOO}^\bullet$ ):



В дальнейшем может формироваться пероксид ЛК ( $\text{LOOH}$ ) и другие продукты, например, эпоксиды и альдегиды:



Стадия обрыва цепи характеризуется формированием различных димеров ЛК:



Однако в присутствии ионов железа и меди происходит разветвление цепной реакции:

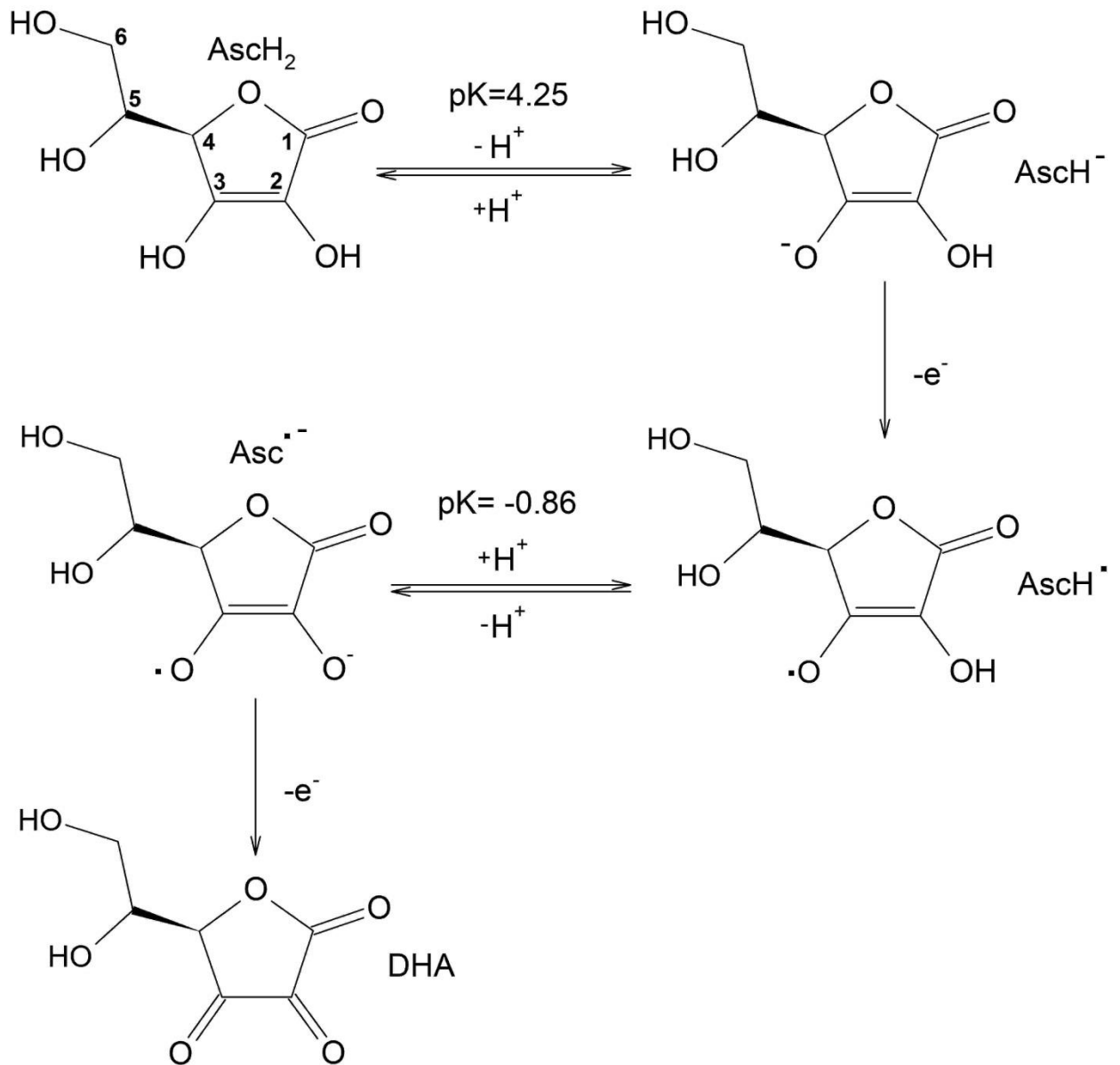


Метод приготовления мицелл ЛК будет подробно описан в главе 2.2.

## 1.2. Антиоксидантные механизмы организма. Редокс активность аскорбиновой кислоты

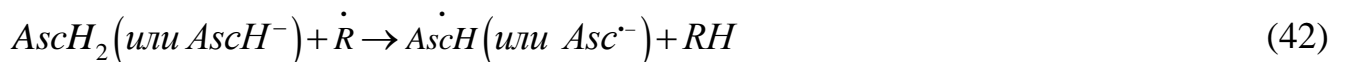
Как уже упоминалось, про-оксидантная активность переходных металлов является основной причиной повреждения различных органических молекул в организме [5]. Тем не менее, организм обладает различными системами, нацеленными на нейтрализацию окислительного стресса, включающими в себя различные антиоксиданты, которые человек получает через пищу или вырабатывает в организме. К подобным молекулам можно причислить альфа-токоферол (витамин E), аскорбиновую кислоту (витамин C,  $\text{AscH}_2$ ), глутатион, и супероксиддисмутазы, способные улавливать различные АКР [6;55;56]. В данной работе будет уделено внимание одному из самых интересных и неоднозначных природных антиоксидантов –  $\text{AscH}_2$ .

$\text{AscH}_2$  наряду с другими витаминами необходим для нормального функционирования организма. В физиологическом диапазоне pH аскорбиновая кислота может находиться в нейтральной форме ( $\text{pH} < 4.25$ ) или депротонированной форме ( $\text{pH} > 4.25$ ). Являясь многоэлектронным донором, аскорбиновая кислота имеет несколько видов радикалов, конечным продуктом окисления является дегидроаскорбат (ДГА) (схема 1). Основываясь на данном свойстве  $\text{AscH}_2$ , помимо лечения авитаминоза, используется в поддерживающей терапии для лечения множества заболеваний, таких как пневмония, грипп, дыхательная недостаточность и др. [57–59]. Кроме того,  $\text{AscH}_2$  обладает рядом физико-химических и биологических функций, включая антиоксидантную, хелатирующую и коферментную активность [60–62].



**Схема. 1.** Химическая структуры аскорбиновой кислоты (AscH<sub>2</sub>) и её продуктов окисления: аскорбат анион (AscH<sup>-</sup>), радикал аскорбата (AscH<sup>•</sup>), анион радикал аскорбата (Asc<sup>•-</sup>) и дегидроаскорбат (ДГА).

Тем не менее, главное свойство AscH<sub>2</sub> заключается в восстановлении различных радикалов включая АКР (Уравнение 42):



, где  $\dot{R}$  является свободным радикалом (см. Таблицу 2).

Являясь мощным водорастворимым антиоксидантом, AscH<sub>2</sub> обеспечивает эффективную защиту клеточных мембран, белков и других биомолекул от многих окислителей, в том числе супероксидного радикала (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), перекиси водорода

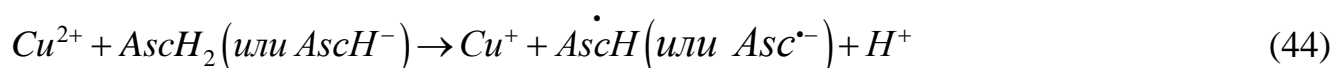
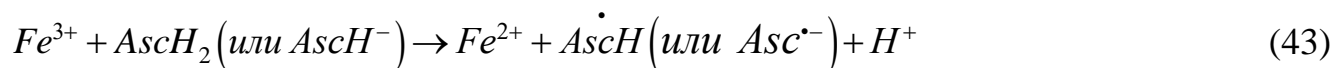


(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), OH<sup>•</sup>, OOH<sup>•</sup> и синглетного кислорода (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) [5;63]. В результате редокс-реакций образуется устойчивый радикал AscH<sup>•</sup>. Однако в физиологических условиях этот радикал депротонируется (pKa -0,86), превращаясь в радикал Asc<sup>•-</sup>. Константы скоростей реакций с наиболее распространенными радикалами были рассчитаны ранее, как показано в Таблице 2 [64].

**Таблица 2** - Константы скорости реакции свободных радикалов с AscH<sub>2</sub> при pH 7.4 [64]

Радикал	k (M <sup>-1</sup> c <sup>-1</sup> )
OH <sup>•</sup> (гидроксильный радикал)	1,1 × 10 <sup>10</sup>
RO <sup>•</sup> (tert-бутил-алкоксильный радикал)	1,6 × 10 <sup>9</sup>
ROO <sup>•</sup> (алкил-пероксильный радикал, в том числе CH <sub>3</sub> OO <sup>•</sup> )	1–2 × 10 <sup>6</sup>
GS <sup>•</sup> (радикал глутатиона)	6 × 10 <sup>8</sup>
TO <sup>•</sup> (радикал токофероксила)	2 × 10 <sup>5</sup>
Asc <sup>•-</sup> (реакция дисмутации)	2 × 10 <sup>5</sup>
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> /OOH <sup>•</sup> (супероксид радикал/перекисный радикал)	1 × 10 <sup>5</sup>

Помимо антиоксидантной активности AscH<sub>2</sub> может проявлять и про-оксидантную активность [65;66], восстанавливая ионы железа и меди в более активное состояние (Уравнения 43,44):



С учетом реакции Фентона между ионами переходных металлов и перекиси водорода (Уравнения 4,6,8,24,26,28,29, см. страницы 18, 19) AscH<sub>2</sub> способна создавать дополнительный канал образования АКР, что может увеличивать окислительный стресс [67;68]. Дополнительно, AscH<sub>2</sub> имеет способность координировать различные металлы что влияет на поведение окислительно-восстановительных процессов с их участием [69;70]. Основным хелатным центром AscH<sub>2</sub> считаются ядра O2 и O3 (Схема 1), способные к образованию нековалентных донорно-акцепторных связей с ионом металла после депротонирования OH-групп [69]. Согласно данным [69;71–73] хелатные

комплексы  $\text{AscH}_2$  с ионами  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  неустойчивы и разлагаются в результате переноса электрона между ионом металла и лигандом.

Подробный обзор антиоксидантных и про-оксидантных свойств  $\text{AscH}_2$  с участием ионов железа и меди, а также её взаимодействие с другими хелаторами и хелатными комплексами был написан мною с со-авторами [66].

### 1.3. Хелаторы ионов металлов

#### 1.3.1. Координационные соединения

Как уже было сказано ранее, существуют различные молекулы, способные связываться с ионами металлов, образуя устойчивые комплексы. В 1893 году А. Вернер выдвинул теорию о существовании устойчивых комплексов – координационных соединений, строение которых не могла описать теория валентности. Данный комплекс образован из центрального атома (иона металла) и лигандов, имеющих в своём составе донорные атомы с не поделённой электронной парой, такие как O, N, S, P и др. Лиганды образуют с центральным атомом нековалентные донорно-акцепторные связи через донорные атомы. В дальнейшем также обнаружилось, что некоторые лиганды, такие как циклопентадиенил (ферроцен) способны координировать ионы металлов посредством донорно-акцепторной связи с  $\pi$ -системами [74].

Выделяют два основных взаимосвязанных свойства веществ, способных образовывать координационные комплексы: координационное число и дентатность. Координационное число – количество донорно акцепторных связей между центральным атомом и донорным атомом ( $\pi$ -связью) в составе лиганда. Дентатность – свойство лиганда, отображающее количество донорных атомов в его составе. Эти параметры зависят как от свойств самих лигандов и центрального атома, таких как заряд, размер, так и от внешних факторов: температура, давление, растворитель. Хелаторы – полидентатные лиганды, способные образовывать комплексы с ионами металлов [75].

### *1.3.2. Влияние хелаторов на окислительно-восстановительные процессы с участием ионов переходных металлов*

На данный момент хелаторы имеют широкое применение в медицине. Одно из главных медицинских направлений использования хелатирующих препаратов является лечение заболеваний, связанных с избытком металлов в организме. Были выведены основные требования, применяющиеся для подбора необходимого хелатора:

- Высокая афинность к определённому металлу;
- Высокие константы равновесия хелатных комплексов;
- Низкая токсичность.

Нужно учитывать, что одним из важных элементов токсичности является редокс активность и способность генерировать АКР. Комплексация ионов металлов способна уменьшить их редокс активность за счёт уменьшения электродного потенциала (энергетический фактор) и замещение вакантных координационных связей иона металла (пространственный фактор) [76]. Учитывая, что сам хелатор способен участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, то все вышеперечисленные факторы, влияющие на редокс активность системы лиганд-металл можно оформить в виде Схемы 2. Подробнее о каждом из аспектов:



**Схема 2.** Влияние хелаторов на окислительно-восстановительные реакции с участием ионов металлов.

Следует отметить, что некоторые хелаторы могут участвовать в окислительно-восстановительных реакциях с образованием АКР в отсутствие ионов металлов [5;77]. Среди таких хелаторов можно выделить антрахиноны, так как они являются не только акцепторами электрона, но и способны восстанавливать ионы переходных металлов, индуцируя тем самым каскад окислительно-восстановительных реакций, в том числе реакцию Фентона (Уравнения 4,6,8,24,26,28,29, см. страницы 18, 19) [78]. Однако существуют группы хелаторов, которые могут действовать в качестве ловушки радикалов. Примером являются фенолсодержащие соединения, в которых гидроксильная группа способна улавливать различные АКР [79;80].

Следующим механизмом является изменение окислительно-восстановительного (электродного) потенциала иона металла. Известно, что металлохелат является эффективным катализатором окислительно-восстановительных реакций в организме, если его потенциал лежит в диапазоне

между  $E^0(\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}) = -0,33 \text{ В}$  и  $E^0(\text{H}_2\text{O}_2, \text{H}^+/\text{HO}^{\cdot}, \text{H}_2\text{O}) = +0,39 \text{ В}$  [81]. Так, если электродный потенциал комплексообразующего металла ниже  $-0,33 \text{ В}$ , то окислительно-восстановительная реакция будет энергетически невыгодной. Однако если электродный потенциал выше  $+0,39 \text{ В}$ , то скорость окислительно-восстановительных реакций становится контролируемой диффузией металлохелата [82].

Наконец, лиганд может оказывать стерическое влияние на возможность закомплексованного металла участвовать в редокс реакциях. [76;81]. Сама стеричность зависит как от эндогенных факторов (координационное число, дентатность, структура и геометрия лиганда) так и от экзогенных (температура, рН, растворитель, ионная сила). Эти факторы нельзя рассматривать по отдельности, так как они взаимосвязаны друг с другом и влияют на реакционную способность образующего комплекс иона металла.

Вышеперечисленные механизмы редокс активностей различных хелаторов и их хелатных комплексов были подробно описаны в нашем обзоре [83].

### ***1.3.3. Фотохимическая активность хелаторов и их комплексов с участием ионов переходных металлов***

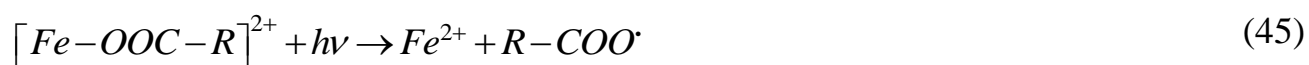
Известно, при сопряженные системы, имеющие в своём составе донорные атомы, характерные для огромного количества органических молекул фотонестабильны и разлагаются под действием видимого излучения с образованием фотопродуктов, способных накапливаться в организме [84]. Кроме того, в случае образования хелатных комплексов происходит батохромный/гипсохромный сдвиг полос поглощения лиганда и/или образование новых полос поглощения согласно эффекту Яна-Теллера [75]. Данный факт также влияет на фотохимические свойства закомплексованного лиганда.

В данный момент некоторые фотохимически активные хелаторы и их хелатные комплексы с ионами металлов используют в различных областях жизнедеятельности человека, в том числе и в медицине для лечения рака.

Специально для этого выделяют отдельное направление: фотодинамическая терапия (ФДТ). Выделяют два основных механизма фотохимической активности фотосенсибилизаторов: перенос электрона с образованием АКР и перенос энергии с образованием синглетного кислорода [85–87].

Однако существуют лекарства, не используемые для ФДТ, способные связываться с ионами металлов и обладающие фотохимической активностью. Вещества, обладающие хромофорными группами, способны разлагаться и трансформироваться под действием видимого света, в результате чего продукты реакции способны негативно влиять на клетки, ткани и органы, ингибируя важные процессы или участвуя в побочных реакциях. В связи с этим, под действием света, у больного могут возникнуть различные осложнения, такие как фотодерматит и другие побочные эффекты, связанные с фототоксической активностью лекарственного препарата и/или накоплению токсичных продуктов фотореакции [84;88].

В частности, известно, что многие комплексы ионов железа с органическими молекулами являются фотохимически активными. Так, например, облучение комплексов Fe(III) с различными органическими кислотами видимым светом приводит к переносу электрона с лиганда на ион железа с образованием редокс активного иона Fe(II) и набора свободных радикалов (Уравнения 45,46) (Схема 3) [89;90].



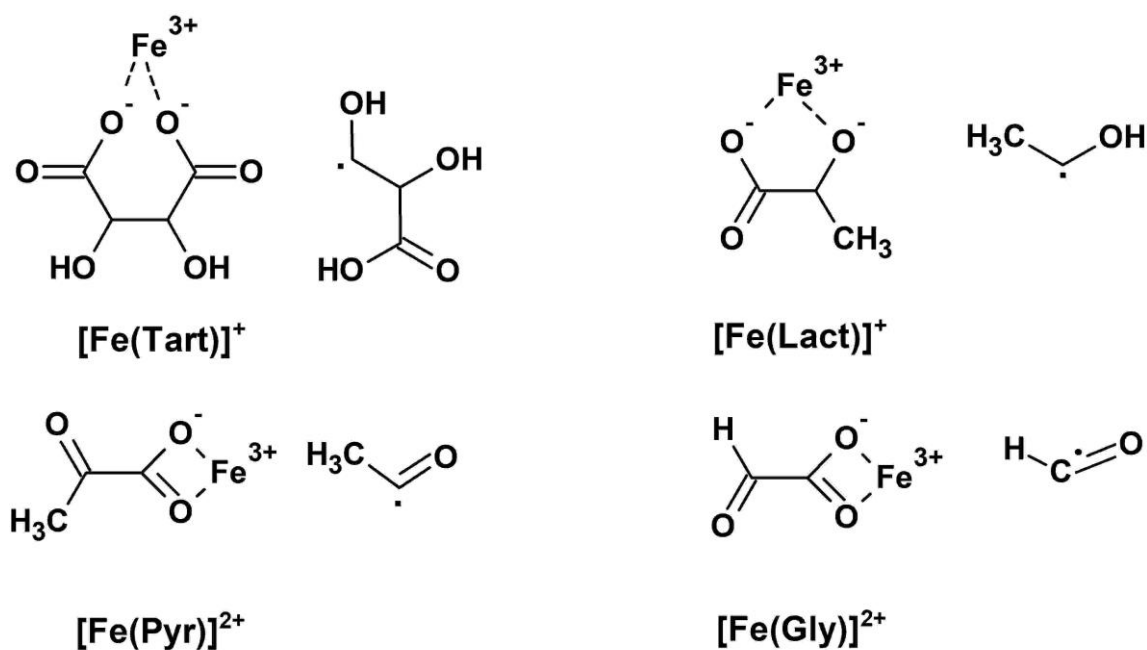


Схема 3. Фотохимическая реакция Fe(III) с различными органическими кислотами [89;90].

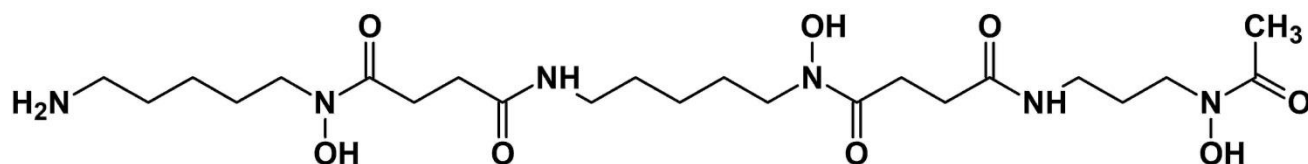
#### ***1.3.4. Препараты-хелаторы ионов металлов, использующиеся для лечения заболеваний, связанных с избытком металлов в организме***

Существуют как экзогенные, так и эндогенные факторы, ведущие к появлению аномального количества металлов в организме. Одним из главных экзогенных факторов является отравление как самим металлом, так металлсодержащим веществом посредством проникновения через кожу, легкие или же приёма пищи. Причинами отравления могут быть как бытовые, так и производственные. Среди всех металлов можно выделить свинец и ртуть, как наиболее токсичные и являются причиной большинства отравлений металлами. Несмотря на отсутствие описания полного механизма действия в литературе, доподлинно известно, что ионы свинца и ртути способны связываться с различными серосодержащими белками, ДНК, РНК, ингибируя их действия за счет конкуренции с другими жизненно важными металлами (например кальцием) или участвуя в окислительно-восстановительных реакциях [91;92]. В настоящий момент, в качестве лекарства для лечения отравлений свинцом и ртутью используют препараты на основе димеркаптосукциновой кислоты. Данное

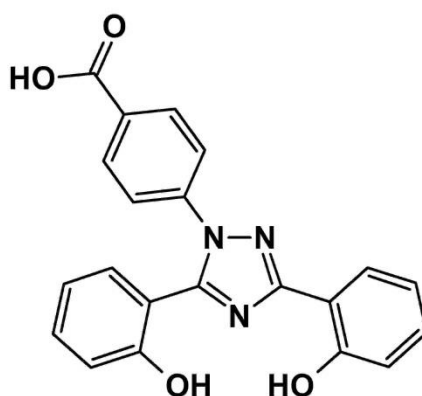
вещество обладает высокой афинностью к ионами свинца и ртути за счет наличия атомов серы в хелатном центре, эффективно связывающих данные ионы [93].

В отличие от экзогенных факторов, эндогенные связаны с нарушениями поглощения, генерации и секреции ионов металлов и металлосодержащих веществ. Чаще всего причиной данных нарушений являются различные генетические заболевания. В данном случае наиболее эффективным решением является ускорение выведения металла из организма или уменьшение его поглощения. В отличие от однократного курса лечения отравления, лечение генетически наследственных заболеваний происходит на протяжении всей жизни, что существенно усиливает требования к свойствам препаратов-хелаторов и их хелатных комплексов.

На данный момент, для лечения заболеваний, связанных с избытком железа в организме, применяют дефероксамин (DFO) (Рисунок 4 сверху), деферазирокс (DFRX) (Рисунок 4 снизу) и деферипрон (L1) (Рисунок 1, см. страницу 6).



DFO



DFRX

**Рисунок 4.** Химическая структура хелаторов дефероксамин (DFO, сверху) и деферазирокс (DFRX, снизу), использующихся для лечения заболеваний, связанных с избытком железа в организме.



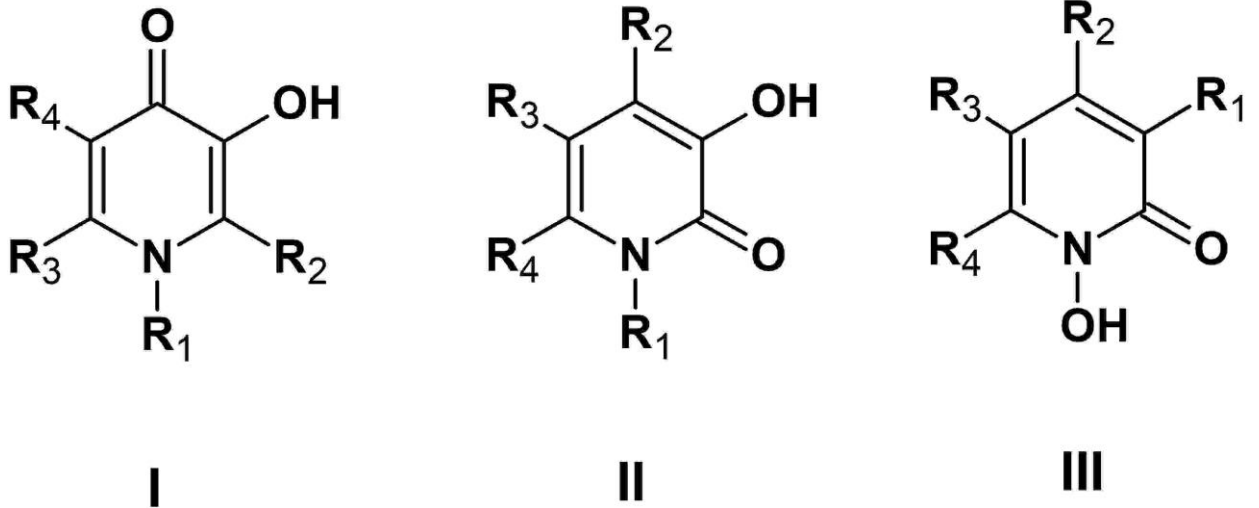
DFO является первым запатентованным препаратом, активно применяющийся для лечения заболеваний, связанных с избытком железа [94;95]. За счет своей структуры хелатор имеет высокую афинность к ионам железа и, связываясь, образует хелатные комплексы 1:1 (одна молекула хелатора на один ион металла) [96]. Тем не менее, данный хелатор имеет существенный недостаток, а именно низкую растворимость в воде, в связи с чем основным методом введения является парентеральный (внутривенный, внутримышечный, подкожный) [97]. Данный фактор, а также его побочные эффекты способствуют возникновению различных патологий или заболеваний, включающих в себя аллергические, слуховые и зрительные реакции, легочные и неврологические расстройства и т.д. [96;97].

DFRX является вторым запатентованным пероральным хелатором железа, официально признанным в 2005 году [97]. Являясь достаточно стабильной молекулой как в фотоиндуцированных реакциях, так и в случае метаболического разложения, DFRX показал себя более эффективным и безопасным с точки зрения метода введения, чем DFO. Тем не менее, данный препарат также обладает побочными эффектами, среди которых кожные патологии и желудочно-кишечные расстройства. Однако наиболее негативные последствия возникают при неправильной дозировке и непостоянном приеме лекарства: острая дисфункция печени и почек, которая может приводить к смерти [96;97]. Про хелатор L1 будет подробно описано в главах 1.3.5 и 1.3.6.

### ***1.3.5. Хелаторы группы гидроксипиридинов***

Хелатор L1 принадлежит классу гидроксипиридинов (ГП). Данная группа веществ начала активно изучаться с 1980-х годов. Их большой интерес в медицинской химии проистекает из сочетания высокой/специфической способности хелатирования металлов с низкой токсичностью для повышения эффективности лекарств.

При создании новых лекарственных препаратов группы ГП были соблюдены две основные стратегии, направленные на определение оптимального лечения различных заболеваний, зависящих от металлов, или на контроль путей развития болезни. Во-первых, улучшение взаимодействия с биологическими сайтами за счет экстрафункционализации, т.е. конъюгации хелатирующей группы с другими молекулярными остатками для повышения эффективности преодоления мембранного барьера и/или обеспечения взаимодействия с одним или несколькими специфическими активными сайтами (например, пептидами). Этот подход использовался для создания многофункциональных агентов, что привело к переходу от одноцелевой к многоцелевой парадигме при открытии лекарств (многоцелевой подход). Во-вторых, повышение эффективности хелатирования на основе увеличения дентатности хелатора (подход полидентатности) путем конъюгации двух или более хелатирующих единиц в одном и том же каркасе для биомолекулярного распознавания или сенсорных целей [98]. Таким образом, было синтезировано около 100 ГП включая бидентатные, тетрадентатные и гексадентатные хелаторы, которые были проверены *in vitro*, *in vivo*. Некоторые из них были также протестированы в клинических испытаниях для медицинского применения при лечении заболеваний, связанных с избытком железа [99–101]. Было протестировано три структуры-прототипа: 3-гидроксипирид-4-оны (I). 3-гидроксипирид-2-оны (II) и 1-гидроксипирид-2-оны (III). В каждом случае сайт связывания ионов металлов состоит из карбонильной и соседней гидроксильной групп (Рисунок 5).



**Рисунок 5.** Химические структуры хелаторов ГП: 3-гидроксипирид-4-он (I). 3-гидроксипирид-2-он (II) и 1-гидроксипирид-2-он (III).

Эти исследования послужили развитию терапевтического направления, связанного с лечением заболеваний, вызванных избытком металлов в организме. Большинство синтезированных ГП представляют собой бидентатные хелаторы, имеющие в качестве координационного центра карбонильную и гидроксильную группы. После проведения *in vitro* и доклинических исследований был выделен L1 (Рисунок 1, см. страницу 6) как наиболее перспективный хелатор для лечения заболеваний, связанных с избытком железа [98;102]. Дальнейшие клинические испытания подтвердили данные выводы [100;103].

В настоящее время найдено множество направлений в медицине, где ГП могут быть использованы: лечение рака, нейродегенеративных заболеваний и пр. (Схема 4) [103].

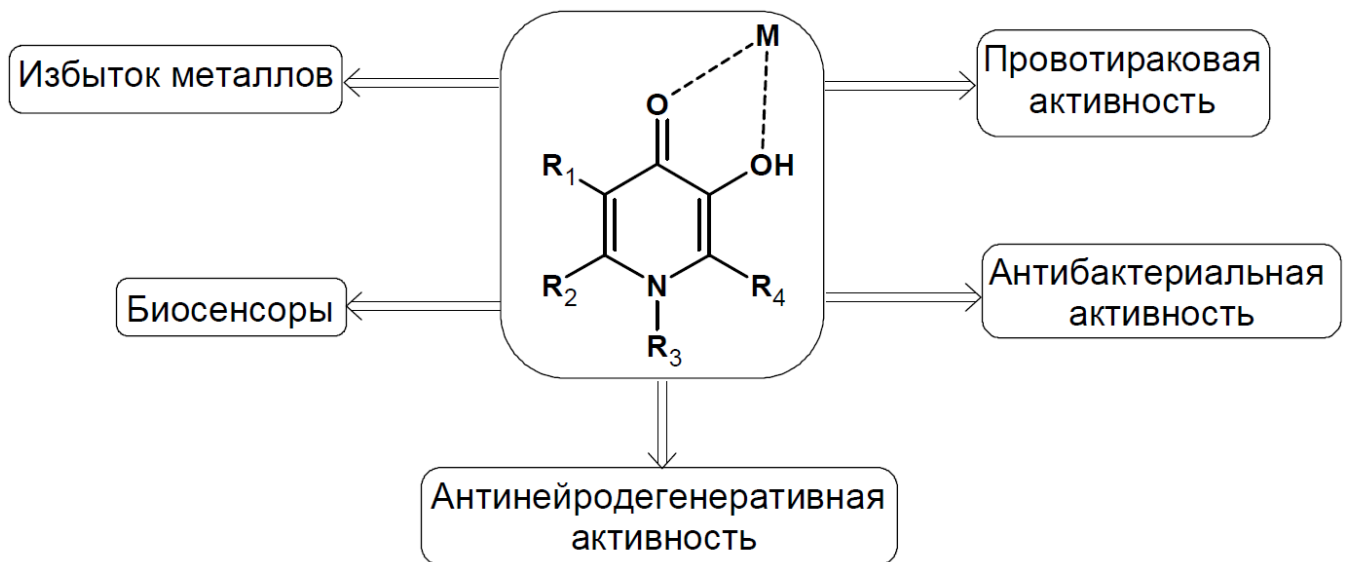


Схема 4. Спектр биологического применения хелаторов-гидроксипиридионов.

### 1.3.6. Деферипрон

На данный момент L1 остается одним из ведущих эффективных препаратов для лечения заболеваний, связанных с накоплением ионов железа в организме в виду его эффективности и низкой токсичности [104;105].

Согласно данным из литературы наибольшую афинность L1 имеет к Предыдущие исследования показали, что L1 имеет более сильное сродство к  $Fe^{3+}$  ( $\log \beta = 35,0$ ), однако способен образовывать стабильные хелатные комплексы и с другими важными металлами в организме человека, например,  $Cu^{2+}$  ( $\log \beta = 19,6$ ) и  $Zn^{2+}$  ( $\log \beta = 13,5$ ). Тем не менее, значительная разница между вышперечисленными константами равновесия показывает высокую селективность L1 к ионам  $Fe(III)$  [104;106].

Что касается хелатирования ионов  $Fe(II)$ , то согласно литературе [89;105;107] хелатные комплексы L1- $Fe(II)$  являются нестабильными и не идентифицируются стационарными оптическими методами. Существуют предположение, что происходит внутрисферный перенос электрона между ионом металла и лигандом.

Известной причиной антиоксидантной эффективности L1 является уменьшение электродного потенциала закомплексованного иона железа (-0,62 В для  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ) [81;108].

Основными причинами высокой биодоступности препарата является его высокая водорастворимость (коэффициент отношения растворимости октанол/вода = 0,19), нейтральность молекулы в физиологическом рН и высокая скорость всасывания [109;110].

Существует информация, что L1 хелатор также проявляет про-оксидантную активность в биологических системах [110]. Механизм заключается в переносе электрона на кислород с Fe-S кластера через L1 с образованием супероксида. Аналогичный механизм про-оксидантной активности L1 также был предложен в исследовании [111]. Про-оксидантная активность L1 в митохондриях и ее влияние на митохондриальный метаболизм были предложены в качестве механизма против раковых клеток и дополнительного пути, стимулирующего L1 для лечения рака [111;112].

## **Выводы по литературному обзору и постановка задачи**

### *Выводы по литературному обзору*

1. Деферипрон способен образовывать хелатные комплексы различной стехиометрии с металлами.
2. В литературе отсутствует информация о фотохимической активности как чистого деферипрона, так и его хелатных комплексов.
3. Несмотря на то, что в литературе описана антиоксидантная активность деферипрона, точной информации о механизме антиоксидантной активности деферипрона в гомогенных и организационных системах отсутствует.

*Постановка задач*

1. Рассчитать константы равновесия и экстинкции хелатных комплексов деферипрона с ионами диамагнитных металлов.
2. Изучить фотохимическую активность чистого деферипрона, а также фотохимическое взаимодействие деферипрона с донорами и акцепторами электрона. Определить структуры радикальных интермедиатов и схемы радикальных реакций методами ядерного магнитного резонанса и химической поляризации ядер.
3. Исследовать влияние комплексообразования на фотохимическую активность деферипрона методами ядерного магнитного резонанса и химической поляризации ядер.
4. Исследовать влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в фотоиндуцированных процессах с участием ионов железа методом электронного парамагнитного резонанса со спиновыми ловушками.
5. Исследовать влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в реакции Фентона с участием ионов железа и меди методом электронного парамагнитного резонанса со спиновыми ловушками.
6. Исследовать влияние аскорбиновой кислоты на антиоксидантную активность деферипрона в реакции Фентона с участием ионов железа и меди методами оптической спектрофотометрии, ядерного магнитного резонанса и электронного парамагнитного резонанса со спиновыми ловушками.
7. Исследовать и сравнить антиоксидантную активность деферипрона и деферазирокса в реакции перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди методом ядерного магнитного резонанса.

## Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Материалы и реактивы

Аскорбиновая кислота ( $\text{AscH}_2$ ) (99%),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (97%),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (>99%),  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (98%),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (97%),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (97%),  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  ( $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ , 98%),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (99%),  $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (98%),  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (99%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (массовая доля 35,5% в растворе  $\text{H}_2\text{O}$ ), диметилсульфоксид (ДМСО, 99%) N-ацетил-L-триптофан (Trp, ~99%), 2,5-дихлор-1,4-бензохинон (дихлорбензохинон, 98%), фосфатно-солевой буфер (ФБ), никотинамид аденин динуклеотид (NADH, 98%), KOH ( $\geq 85\%$ ), HCl (37% раствор), KOD (массовая доля 40% в растворе  $\text{D}_2\text{O}$ , доля D  $\geq 98\%$ ), DCl (массовая доля 35% в растворе  $\text{D}_2\text{O}$ , доля D  $\geq 99\%$ ),  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9%),  $\text{CD}_3\text{OD}$  (99,8%) и  $\text{C}_6\text{D}_6$  (99,6%) были приобретены у фирмы Sigma-Aldrich (Москва, Россия). Динатриевая соль антрахинон-2,6-дисульфоновой кислоты (AQDS, 98%) была приобретена у фирмы TCL (Франция, Россия). Деферипрон (L1, 98%) был приобретен у компании LIPOMED Inc (Амстердам, Швейцария). Деферазирокс (DFRX, 99%) был закуплен у Shanghai Daeyeon Chemicals Co., Ltd. (Шанхай, Китай). Спиновые ловушки ТМЮ (2,2,4-триметил-2Н-имидазол-1-оксид, 98%), PBN (альфа-фенил N-бутил нитрон, 98%), DMPO (5,5-диметил-1-пирролиноксид, 98%) и TEMP (2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидон, 95%) были приобретены через поставщика Fluka. Линолевая кислота (ЛК, чистота >99,0%) были приобретены у фирмы Aladdin Co., Ltd. Все соединения были использовались в оригинальном виде.

### 2.2. Метод приготовления мицелл линолевой кислоты

Подготовка образца для исследования влияния хелаторов L1 и DFRX на перекисное окисление мицелл ЛК проходила следующим образом. Для приготовления мицелл 1 мкл ЛК предварительно растворяется в 500 мкл хлороформа. Для образования липидной пленки раствор высушивается продувкой

образца воздухом в течение 30 мин. В дальнейшем липидная пленка гидратировалась в ФБ (рН 7,4). Для образования мицелл необходимы определённые условия, такие как концентрация ЛК ( $>0,021$  мМ) и рН раствора ( $>4,77$ ) [113]. В результате, образуются мицеллы разного размера и формы. Для создания мицелл одинакового размера раствор выдерживался в ультразвуковой ванне в течение 1 часа. Ультразвук дезорганизует липидные мембраны ассоциатов, в результате чего система стремится к наименьшему уровню энергии, что приводит к оптимальному размеру образующихся мицелл. Конечная концентрация ЛК в растворе составляла 3,5 мМ. Более подробно метод описан в [114].

В экспериментах с L1 хелатор добавлялся после создания мицелл, а с DFRX – на этапе растворения в хлороформе для улучшения растворимости.

## **2.3. Методы исследования**

### ***2.3.1. Ядерный магнитный резонанс***

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) является одним из основополагающих методов для структурного анализа и исследования взаимодействий как на молекулярном, так и на атомарном уровне. В течение почти 80 лет данный метод активно развивался, а также увеличивался спектр его применения. На данный момент ЯМР активно применяется не только в химии и физике, но и в биологии и медицине. Для исследования живых систем или их упрощенных моделей чаще всего используют жидкостной ЯМР, позволяющий проводить исследования в различных растворителях и/или условиях, таких как рН или температура.

Являясь многопараметрическим методом, ЯМР позволяет получить детальную информацию о структуре систем и их динамики. Среди таких параметров можно выделить следующие:



- Величина магнитного поля, на котором происходит резонанс магнитовосприимчивого ядра ( $^1\text{H}$ ,  $^2\text{D}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ );
- Величина спин-спинового взаимодействия, которая зависит от окружения ядра;
- Времена спин-решеточной ( $T_1$ ) и спин-спиновой ( $T_2$ ) релаксации, оказывающие влияние на ширину спектральных линий.

С помощью ЯМР также можно изучать процессы образования координационных соединений. Для этого вводят понятие скорости обмена, связанное с средним временем  $\tau$  (по ансамблю) нахождения исследованного лиганда в одном из состояний (свободном или закомплексованном). Важно учитывать, что при медленном обмене ( $\tau > 10^{-1}$  с) химические сдвиги одних и тех же протонов протонов, близких к хелатному центру у свободного и закомплексованного лиганда могут значительно различаться вплоть до непосредственно дифференциации сигналов мультиплетов. При уменьшении  $\tau$  сигналы начинают «двигаться» друг к другу вплоть до слияния сигналов в один. В связи с этим системы с быстрым обменом сложнее изучать, чем с медленным. [115].

Для расчета констант равновесия и химических сдвигов протонов различных форм лиганда используют следующую систему уравнений (Уравнения 47-50):

$$\delta_{\text{набл}} \frac{1}{C_L} = \sum_i \delta_i [ML_i] \quad (47)$$

$$K_i = \frac{[ML_i]}{[ML_{i-1}][L]} \quad (48)$$

$$C_L = [L] + \sum_i i [ML_i] \quad (49)$$

$$C_M = [M] + \sum_i [ML_i] \quad (50)$$

Тем не менее, получение однозначного решения данной системы уравнений возможно в относительно простых системах, а именно комплексах 1:1, или 2:1 с

высокими константами равновесия и одним хелатным центром [116–118]. В остальных случаях получение решения затруднительно, даже используя расчетные методы для вычисления химических сдвигов соединений [119].

Кроме того, химические сдвиги могут нести не только кинетическую, но структурную информацию, связанную с образованием хелатного комплекса, что усложняет анализ данных.

Таким образом, расчет констант стабильностей исследуемых комплексов было решено вести на основе спектрофотометрических данных. Более подробно об этом написано в главе 2.3.4.

Тем не менее, в данной работе метод ЯМР был применен для анализа полученных продуктов фотохимических реакций с участием L1, процессов с участием  $\text{AscH}_2$  и хелатных комплексов Fe-L1, а также кинетик перекисного окисления мицелл ЛК с участием ионов железа и меди в отсутствии и присутствии хелаторов L1 и DFRX. Эксперименты проводились на спектрометрах ЯМР фирмы Bruker DPX-200 (резонансная частота 200 МГц для  $^1\text{H}$ ) AVND-500 (резонансная частота 500 МГц для  $^1\text{H}$ ).

### ***2.3.2. Химическая поляризация ядер***

Химическая поляризация ядер (ХПЯ) является мощным методом изучения кинетики и механизмов свободнорадикальных процессов [120–124]. Появление эффектов ХПЯ обычно рассматривается как свидетельство свободнорадикального механизма реакции. Интенсивности сигналов в спектрах ХПЯ коррелируют со значениями и знаками констант сверхтонкого взаимодействия (СТВ) радикального предшественника поляризованного продукта. Таким образом, анализ спектра ХПЯ может дать информацию о структуре промежуточных радикалов - предшественников поляризованных продуктов.

Известно несколько механизмов образования ХПЯ. Один из самых хорошо изученных является образование радикальной пары. Радикальная пара может быть образована либо в результате разрыва химической связи, либо в результате

переноса электрона. В качестве примера представлена общая схема радикальной реакции между донором электрона (D) и акцептором электрона (A) (Схема 5). [125].

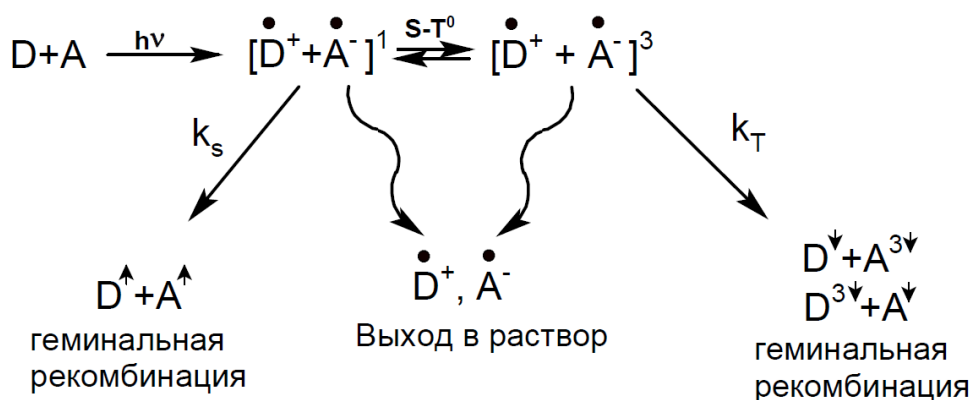


Схема 5. Общая схема формирования ХПЯ для ион-радикальной пары.

Эффект ХПЯ объясняется синглет-триплетной конверсии в геминальной паре, связанной с СТВ неспаренных электронов с ядрами (СТВ-механизм) либо различием зеемановских частот неспаренных электронов радикалов ( $\Delta g$ -механизм) [120–124].

Еще в 1970 году Каптейн разработал правила, которые используют для анализа спектра ХПЯ по сей день [126]. Благодаря данным правилам можно получить информацию о знаке поляризации ХПЯ. Выделяют два эффекта ХПЯ: интегральный (отличие всего мультиплета линий от равновесного) и мультиплетный (отличие отдельной линии мультиплета). Данные эффекты могут быть как отрицательными (E - эмиссия), так и положительными (A - адсорбция) [120–124].

Следуя правилам Каптейна можно определить знак поляризации интегральной и мультиплетной ХПЯ используя Уравнения 51 и 52 соответственно:

$$\Gamma_{Int} = \mu * \varepsilon * \Delta g * a_k \quad (51)$$

$$\Gamma_{Mult} = \mu * \varepsilon * \Delta g * a_i * a_j * j_{ij} * \sigma_{ij} \quad (52)$$

Параметры, использующиеся в Уравнениях 51 и 52, описаны в таблицах 3 и 4. Произведение соответствующих параметров дает знак ХПЯ, что может быть использовано при анализе спектра чтобы получить информацию о радикальных интермедиах, а также предсказать знак ХПЯ для конкретных систем.

**Таблица 3** - Значения параметров, используемых для анализа интегрального ХПЯ

Параметр	Знак «+»	Знак «-»
$\mu$	Триплетный предшественник	Синглетный предшественник
$\varepsilon$	Продукты геминальной рекомбинации	Продукт рекомбинации в объеме
$\Delta g$ (разница g факторов)	>0	<0
a (знак константы СТВ соответствующего ядра)	>0	<0

**Таблица 4** - Значения параметров, используемых для анализа мультиплетного ХПЯ

Параметр	Знак «+»	Знак «-»
$\mu$	Триплетный предшественник	Синглетный предшественник
$\varepsilon$	Продукты геминальной рекомбинации	Продукт рекомбинации в объеме
$\Delta g$ (разница g факторов)	>0	<0
$a_i, a_j$ (знак констант СТВ ядер i и j)	>0	<0
$j_{ij}$ (знак константы спин-	>0	<0

спинового взаимодействия ядер $i$ и $j$ )		
$\sigma_{ij}$	ядра $i$ и $j$ принадлежат одному радикалу	ядра $i$ и $j$ принадлежат разным радикалам

В данной работе метод ХПЯ был использован для исследования радикальных процессов, происходящих в результате фотохимической реакции L1 и его хелатных комплексов с ионами металлов с донорами и акцепторами электрона.

В исследовании использовалась фотохимическая приставка к спектрометру ЯМР [125]. В качестве источника света использовался эксимерный импульсный лазер Lambda-Physic EMG 101 (рабочая смесь XeCl, длина волны 308 нм, энергия импульса 100 мДж, проводимая к образцу энергия порядка 20 мДж). Лазер и спектрометр синхронизированы, чтобы иметь возможность устанавливать точную привязку по времени между импульсом света и радиочастотным импульсом регистрации спектра.

### *2.3.3. Электронный парамагнитный резонанс*

Помимо ЯМР в работе также был использован еще один метод радиоспектроскопии – электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). В отличие от ЯМР данный метод позволяет зарегистрировать и идентифицировать частицы с одним или несколькими неспаренными электронами. ЭПР спектроскопия применяется во многих физико-химических, а также биологических областях, включающих катализ, процессы горения и окисления, строения и реакционной способности радикалов и ион-радикалов, а также в фотохимии и радиационной химии. Стандартный метод ЭПР позволяет регистрировать радикальные интермедиаты со временем жизни больше микросекунд. Для обхода данного ограничения был введен метод спиновых ловушек.

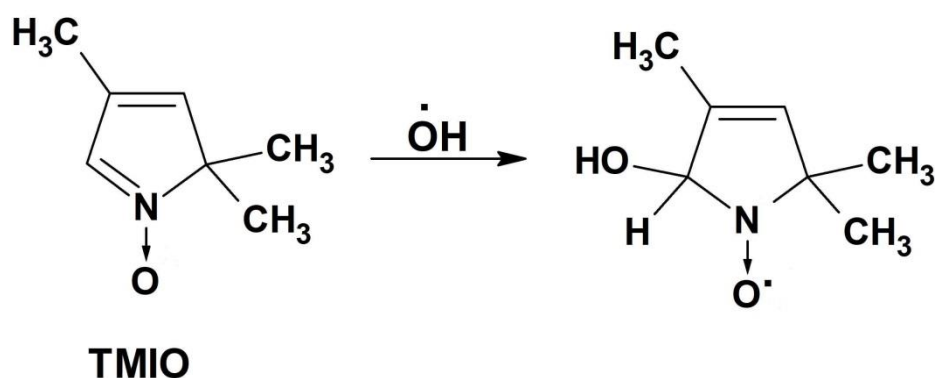
## 2.3.3.1. Спиновые ловушки

Данный метод способен определять по спектрам ЭПР наличие короткоживущих радикалов в растворе (АКР) путем связывания короткоживущего радикала со спиновой ловушкой. В результате образуются относительно стабильные спиновые аддукты. Основами для создания большинства известных спиновых ловушек являются различные нитрозосоединения и нитроны [127–130].

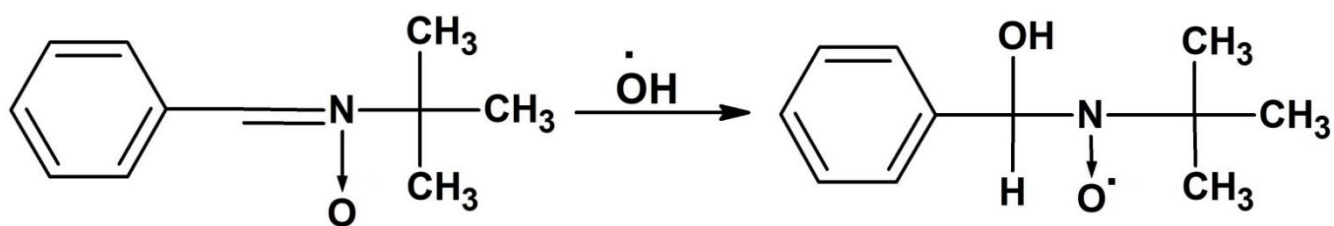
Высокая чувствительность спиновой ловушки к структуре заловленного радикала, выражающаяся в широком диапазоне значений констант СТВ  $a_N$  для различных нитроксидов. Дополнительным фактором, позволяющим провести однозначное соответствие между видом спинового аддукта и спектром ЭПР за счет ненулевых констант СТВ на соседних к азоту магнитных ядрах [127–130].

В настоящее время синтезирован широкий спектр спиновых ловушек, как неселективных, так и способных залавливать определенные виды радикалов и под определенную систему. За счет относительной стабильности спиновых аддуктов метод ЭПР со спиновыми ловушками позволяет получить не только качественные, но и количественные результаты.

В данной работе использовались спиновые ловушки ТМЮ (2,2,4-триметил-2Н-имидазол-1-оксид) (Схема 6) и РВН (альфа-фенил N-бутил нитрон) (Схема 7). Их спектр применения направлен на регистрацию АКР, в частности  $\text{OH}^\bullet$  [127;128].



**Схема 6.** Структура спиновой ловушки ТМЮ (2,2,4-триметил-2Н-имидазол-1-оксид) и реакция с образованием ТМЮ-ОН спинового аддукта.

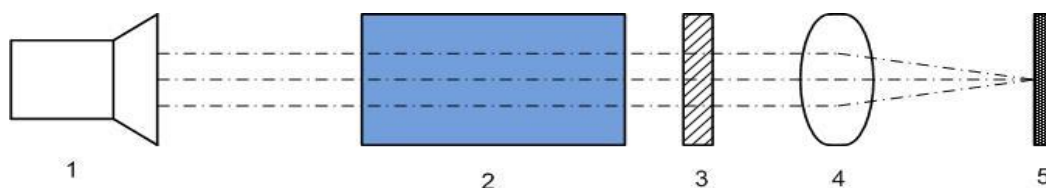


**Схема 7.** Структура спиновой ловушки PBN (альфа-фенил N-бутил нитрон) и реакция с образованием PBN-OH спинового аддукта.

Исследование антиоксидантной активности L1 в реакциях фотоокисления аквакомплексов Fe(III), реакции Фентона с ионами железа и меди, а также исследование взаимодействия AscH<sub>2</sub> с хелатными комплексами Fe-L1 и Cu-L1 проводились с помощью спектрометра Bruker EMX EPR (частота 10,112 GHz, мощность 20,65 МВт; частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 1,00 Гс).

### 2.3.3.2. Фотохимические исследования образования активных кислородных радикалов

Специально для фотохимических исследований методом ЭПР со спиновыми ловушками была спроектирована и создана фотохимическая приставка к ЭПР спектрометру (Схема 8):



**Схема 8.** Фотохимическая приставка к ЭПР спектрометру: 1 - Ртутная лампа ДРШ-1000; 2 - Водяной фильтр; 3 - Светофильтр (Hg366 и Hg546); 4 - Линза; 5 – Образец.

Свет, генерируемый ртутной лампой, проходя через водяной фильтр и светофильтры, фокусируется на образце, находящийся в ЭПР спектрометре, с помощью оптической линзы.

В экспериментах использовалась ртутная лампа в режиме, отличном от номинального, указанного в паспорте. В данном случае схема была собрана таким

образом, чтобы получить тлеющий разряд малой мощности. Спектр излучения в этом случае близок к спектру излучения лампы низкого давления, например, бактерицидной.

Помимо спиновых ловушек ТМЮ и РВН, применяющихся для обнаружения АКР, в фотохимических исследованиях методом ЭПР была также использована спиновая ловушка 2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидон (ТЕМР) (Схема 9), способная взаимодействовать с  $^1\text{O}_2$  с образованием спинового аддукта ТЕМРО:

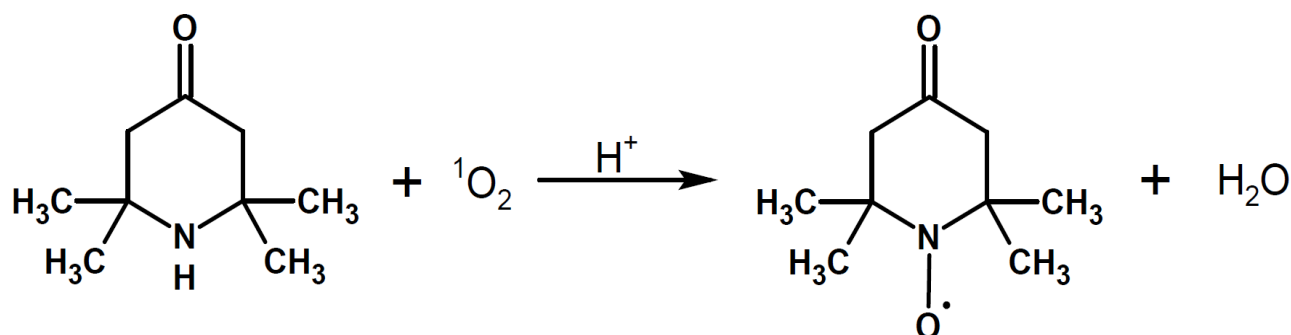


Схема 9. Структура спиновой ловушки ТЕМР (2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидон) и реакция с  $^1\text{O}_2$  с образованием спинового аддукта ТЕМРО.

#### 2.3.4. Метод оптической спектрофотометрии

Исследование комплексообразования L1 с ионами железа в присутствии  $\text{AscH}_2$  проводились на спектрофотометре СФ-2000 фирмы ЛОМО в 1 см кварцевых кюветах. Данный спектрофотометр предназначен для измерения спектральных коэффициентов пропускания как жидких, так и твердых прозрачных образцов.

При образовании координационного комплекса между ионом металла и лигандом образуется нековалентная донорно-акцепторная связь. В зависимости от типа иона, его координационного числа донорной группы лиганда, дентатности, строения, заряда, внешних условий, таких растворитель, температура, pH и др. образуются комплексы различной геометрии, что в свою очередь ведет к различной гибридизации электронных орбиталей закомплексованного иона. Данные факторы отражаются на электронных переходах иона металла и лиганда



что может наблюдаться в изменении спектра поглощения в UV-Vis диапазоне, а именно батохромный/гипсохромный сдвиг спектральных полос лиганда, а также исчезновение/появление дополнительных полос поглощения, соответствующих расщеплению d- или f- энергетических уровней иона металла.

### ***2.3.5. Расчет констант равновесия и экстинкций хелатных комплексов***

Один из самых используемых методов для расчета стехиометрии, констант равновесия и экстинкции комплексов является метод Бенези-Хилдебранда. Данный подход основан на анализе изменения оптической плотности раствора в зависимости от соотношения концентраций лиганда и металла при их фиксированной сумме концентраций. Несмотря на достоинства данного метода, существует несколько ограничений и различных проблем по его применению. В частности, расчетная модель пренебрегает концентрацией свободного иона металлов. Кроме того, в случае, когда к одному иону металлов может присоединиться несколько лигандов модель не учитывает константы равновесия и экстинкции промежуточных комплексов.

В связи этим, для определения параметров комплексообразования по экспериментальной зависимости относительного поглощения от концентрации металла, была написана программа на языке Python. Для упрощения расчетов были введены следующие допущения:

- Реакции комплексообразования описываются как реакции присоединения;
- Модели не учитывают реакцию депротонирования молекулы L1.

#### ***2.3.5.1. Расчет комплексов 1:1***

Расчет параметров производился исходя из следующей модели комплексообразования:



, где L - поглощающий свет лиганд, M - металл. Константа равновесия в этом случае равна

$$K_1 = \frac{[LM]}{[L][M]} \quad (54)$$

Пусть  $C_M$  и  $C_L$  - исходные концентрации металла и лиганда в растворе, соответственно.

Тогда

$$C_M = [M] + [LM] \quad (55)$$

$$C_L = [L] + [LM] \quad (56)$$

Используя Уравнение 54 перепишем Уравнения 55 и 56:

$$C_M = [M] + K_1[L][M] \quad (57)$$

$$C_L = [L] + K_1[L][M] \quad (58)$$

Выразим из Уравнения 57 [M] и подставим это выражение в Уравнение 58.

Мы получим квадратное уравнение:

$$K_1[L]^2 + (K_1C_M - K_1C_L + 1)[L] - C_L = 0 \quad (59)$$

Относительное поглощение лиганда равно

$$\Delta D = \varepsilon_0[L] + \varepsilon_1 K_1[L][M] - \varepsilon_0 C_L \quad (60)$$

, где  $\varepsilon_0$  и  $\varepsilon_1$  - коэффициенты экстинкции лиганда и комплекса, соответственно. Подставляя в Уравнение 60 решение Уравнения 59, получаем зависимость относительного поглощения лиганда от концентрации металла в растворе.

Программа производит численное решение Уравнения 59 для каждой экспериментальной точки  $C_M$ . Таким образом, получается Уравнение 60. Затем методом наименьших квадратов подбираются наилучшие параметры  $\varepsilon_1$  и  $K_1$  и рассчитывается матрица ковариаций.

## 2.3.5.2. Расчет комплексов 2:1

Расчет параметров производился исходя из Уравнений 53 и 61:



Константа равновесия для комплекса 1:1 рассчитывается исходя из Уравнения 54. В случае присоединения второго лиганда, уравнение будет следующего вида:

$$K_2 = \frac{[L_2M]}{[LM][L]} \quad (62)$$

Аналогично модели комплекса 1:1 концентрации металла и лиганда в растворе описываются следующим образом:

$$C_M = [M] + [LM] + [L_2M] \quad (63)$$

$$C_L = [L] + [LM] + [L_2M] \quad (64)$$

Используя Уравнения 54 и 62 перепишем Уравнения 65 и 66:

$$C_M = [M] + K_1[L][M] + K_1K_2[L]^2[M] \quad (65)$$

$$C_L = [L] + K_1[L][M] + K_1K_2[L]^2[M] \quad (66)$$

Выразим из Уравнения 65  $[M]$  и подставим это выражение в Уравнение 66, получая кубическое уравнение:

$$K_1K_2[L]^3 + (2K_1K_2C_M - K_1K_2C_L)[L]^2 + (K_1C_M - K_1C_L + 1)[L] - C_L = 0 \quad (67)$$

Относительное поглощение лиганда равно

$$\Delta D = \varepsilon_0[L] + \varepsilon_1K_1[L][M] + \varepsilon_2K_1K_2[L]^2[M] - \varepsilon_0C_L \quad (68)$$

, где  $\varepsilon_0$ ,  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_2$  - коэффициенты экстинкции лиганда, комплекса 1:1 и комплекса 2:1, соответственно. Подставляя в Уравнение 68 решение Уравнения 67, получаем зависимость относительного поглощения лиганда от концентрации металла в растворе.

Расчетная программа для комплекса 2:1 производит численное решение Уравнения 67 для каждой экспериментальной точки  $C_M$ . Таким образом, получаются коэффициенты в Уравнении 68. Затем методом наименьших квадратов подбираются наилучшие параметры  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$ ,  $K_1$  и  $K_2$  и рассчитывается матрица ковариаций.

В результате программа выдает кривую, приближенно описывающую экспериментальную концентрационную зависимость, значения констант равновесия и соответствующих коэффициентов экстинкции этих комплексов.

### 2.3.5.3. Расчет комплексов 3:1

Для реакции L1 с Al была написана другая программа для расчета констант равновесия и экстинкции. В её основу легла следующая модель: к иону Al сразу присоединяются сразу три молекулы L1 (Уравнение 69).



Данная модель упрощена по сравнению расчетами комплексов 2:1 в связи с большим количеством вариативных параметров, что увеличивает расчетную ошибку. Концентрации металла и лиганда в соответствии с константой равновесия описываются в виде:

$$C_M = [M] + K_3 [L]^3 [M] \quad (70)$$

$$C_L = [L] + K_3 [L]^3 [M] \quad (71)$$

Выражая [M] из Уравнения 70 и подставляя в Уравнение 71, получаем:

$$[L]^4 K_3 + [L]^3 K_3 (C_M - C_L) - C_L = 0 \quad (72)$$

Относительное поглощение равно:

$$\Delta D = \varepsilon_0 [L] + \varepsilon_3 K_3 [L]^3 [M] - \varepsilon_0 C_L \quad (73)$$

, где  $\varepsilon_0$ ,  $\varepsilon_3$  - коэффициенты экстинкции лиганда и комплекса 3:1 соответственно.

Программа производит численное решение Уравнения 72 для каждой экспериментальной точки  $S_M$ . Таким образом, получаются коэффициенты в зависимости (73). Затем методом наименьших квадратов подбираются наилучшие параметры  $\varepsilon_3$  и  $K_3$  и рассчитывается матрица ковариаций.

### ***2.3.6. Масс-спектрометрия***

Для идентификации продуктов фотодегградации растворов L1 был использован MALDI-TOF/TOF спектрометр Ultraflex III (Bruker Daltonics). Запись масс спектра продуктов L1 проводилась в режиме положительных ионов в диапазоне 0-1000 m/z.

### ***2.3.7. Измерение pH***

Для измерения pH водных растворов использовался pH метр Knick Portamess 911.

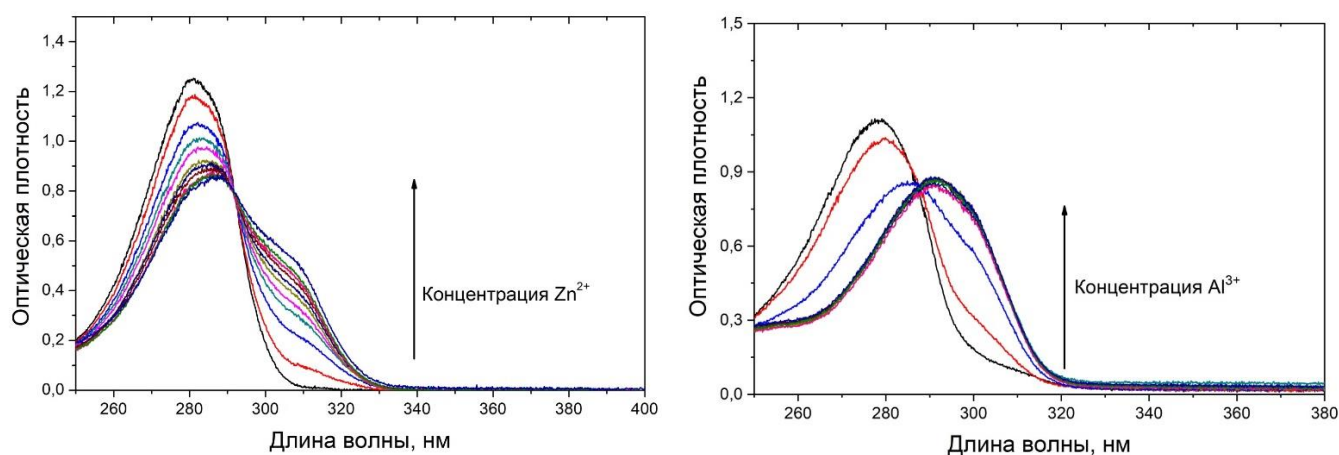
### Глава 3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕФЕРИПРОНА С ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

Глава 3 посвящена исследованию комплексообразования деферипрона с ионами Ca(II), Zn(II), Cu(II) и Al(III) методом оптической спектрофотометрии. Цель данного исследования является определение основной стехиометрии хелатных комплексов деферипрона с ионами металлов в условиях, используемых для экспериментов, описанных в следующих главах, а также констант равновесия и экстинкций комплексов.

#### 3.1. Комплексообразование деферипрона с ионами диамагнитных металлов

Несмотря на то, что в литературе имеются данные о хелатной активности L1 в отношении непреходных металлов (Zn, Ca, Al) [104;131], физико-химические и фотохимические свойства данных соединений были изучены недостаточно или подобные данные отсутствуют. Поэтому для изучения фотохимической активности хелатных комплексов L1 с ионами металлов было принято решение в первую очередь исследовать комплексообразование L1 с ионами металлов Ca, Zn и Al.

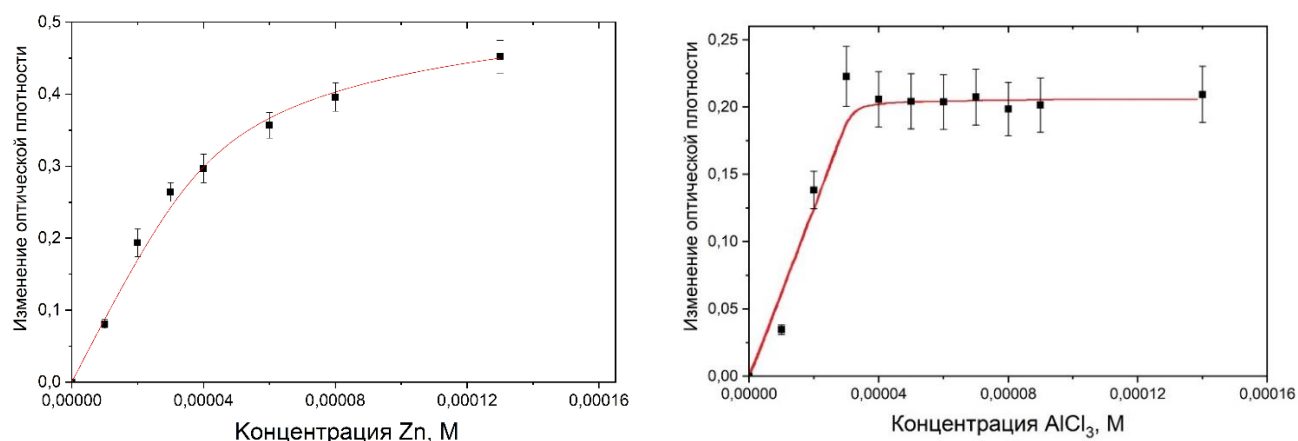
Для доказательства образования хелатных комплексов L1 были записаны оптические спектры поглощения растворов L1 при различных концентрациях солей металлов. В случае ионов Ca и Zn изменения оптического поглощения водных растворов, характерных для образования хелатных комплексов, не наблюдалось. В водно-этанольных смесях наблюдаются аналогичные изменения в спектрах поглощения, однако степень изменения меньше, что приводит к увеличению погрешности при обработке результатов. Наилучшие результаты были видны в растворе EtOH. Спектры L1 в присутствии хлорида алюминия были измерены в ФБ с pH 7,4. В качестве примера на Рисунке 6 представлены спектры поглощения раствора L1 с ионами Zn и Al.



**Рисунок 6. А:** Спектры поглощения растворов L1 (0,1 мМ) в растворе EtOH в зависимости от концентрации  $ZnCl_2$  (от 0 до  $9 \cdot 10^{-5}$  М с шагом  $10^{-5}$  М, конечная точка  $1,3 \cdot 10^{-4}$  М); **Б:** Спектры поглощения растворов L1 (0,1 мМ) в ФБ (рН 7,5) в зависимости от концентрации  $AlCl_3$  (от 0 до  $10^{-4}$  М с шагом  $10^{-5}$  М до  $10^{-4}$  М конечная точка  $1,5 \cdot 10^{-4}$  М). Температурные условия экспериментов: 25 °С.

Как видно из Рисунка 6, при определенной концентрации соли в растворе, оптическая плотность раствора на длине волны полосы поглощения комплекса L1 с ионом металла перестает изменяться, что говорит о том, что практически весь лиганд закомплексован. Наличие изобестических точек указывает, что в растворах преобладают хелатные комплексы единой стехиометрии (для каждой из солей металлов своё соотношение металл:лиганд).

В случае ионов кальция отсутствие изменений в спектрах поглощения на длине волны поглощения хелатных комплексов наступает при соотношении концентраций хелатор:ион металла, соответствующее L1:Ca=2:1. Для более подробного анализа спектральных и кинетических характеристик образованных хелатных комплексов L1 с ионами металлов были построены зависимости изменения оптической плотности раствора L1 от концентрации ионов металла на длине волны 310 нм. В качестве примера на Рисунке 7 представлены экспериментальные и расчетные зависимости изменения оптической плотности растворов L1 с ионами Zn и Al соответственно.



**Рисунок 7. А:** Изменение оптической плотности раствора L1 (0,1 мМ) в EtOH относительно изменения концентрации  $ZnCl_2$  (от 0 до  $9 \cdot 10^{-5}$  М с шагом  $10^{-5}$  М, конечная точка  $1,3 \cdot 10^{-4}$  М) на длине волны 310 нм; **Б** Изменение оптической плотности раствора L1 (0,1 мМ) в ФБ (рН 7,5) при изменении концентрации  $AlCl_3$  (от 0 до  $10^{-4}$  М с шагом  $10^{-5}$  М до  $10^{-4}$  М, конечная точка  $1,5 \cdot 10^{-4}$  М) на длине волны 310 нм. За нулевую точку принята оптическая плотность раствора в отсутствии соли металла в растворе. Красной линией обозначена расчетная кривая.

Для получения количественной информации о стехиометрии комплексов, константах равновесия образующихся комплексов и их коэффициентах экстинкции была написана программа с использованием уравнений закона действующих масс. Программа учитывала ступенчатое образование комплексов 2:1 и 1:1 для комплексов с ионами Zn и Ca. Модель расчета комплексов 1:1 и 2:1 подробно описано в главах 2.3.5.1 и 2.3.5.2 соответственно.

В случае ионов Al данная кинетическая модель не подходит, так как дальнейшее увеличение количества параметров в системе ведет к увеличению расчетной ошибки, что сказывается на достоверности результатов. Поэтому для расчета констант равновесия и экстинкции хелатных комплексов с ионами алюминия была написана программа, в основу которой легла упрощенная кинетическая модель, пренебрегающая образованием комплексов 1:1 и 2:1 (см. главу 2.3.5.3). Использование подобной расчетной модели для данной системы оправдано, так как, судя по характеру изменения оптической плотности раствора от концентрации  $AlCl_3$ , равновесие смещено в сторону комплекса 3:1 (Рисунки 6Б и 7Б). На основании расчетов были построены теоретические кривые зависимости изменения оптических плотностей растворов от концентрации солей металлов



(Рисунок 7) а также рассчитаны константы равновесия и коэффициенты экстинкции хелатных комплексов. (Таблица 5).

**Таблица 5** - Расчетные константы равновесия комплексов L1 (в  $M^{-1}$  для ионов Ca, Zn и  $M^{-3}$  для ионов Al) и коэффициентов экстинкций ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) на 310 нм в различных растворителях

	$\epsilon_1$	$\epsilon_2$	$K_1$	$K_2$
L1 0,1 мМ + ZnCl <sub>2</sub> ; EtOH	6400±800	8400±400	$(9 \pm 2,5) \times 10^4$	$(2 \pm 1,2) \times 10^4$
L1 0,1 мМ + CaCl <sub>2</sub> ; EtOH	700±200	2100±100	$(1 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1 \pm 0,2) \times 10^5$
L1 0,1 мМ + AlCl <sub>3</sub> ; ФБ (рН 7.4)*	900±500		$(1.2 \pm 0,5) \times 10^{17}$	

\*В случае ионов Al  $K_1$  является константой равновесия реакции (Уравнение 73, см. страницу 52), а  $\epsilon_1$  – экстинкцией комплекса [AlL<sub>3</sub>].

Как можно заметить, превалирующей стехиометрией для комплексов L1 с ионами Ca и Zn в данных условиях является соотношение 2:1 (два лиганда на один ион металла). Кроме того, видно, что афинность L1 для ионов Al выше, чем для ионов кальция и цинка, что согласуется с литературными данными [104;131]. Полученные результаты были использованы в дальнейшем для изучения фотохимических свойств хелатных комплексов L1 с ионами металлов.

### 3.2. Комплексообразование деферипрона с ионами меди

В случае ионов меди известно, что данный ион имеет высокую афинность к L1, и способен конкурировать с железом за возможность связываться с хелатором [132;133]. Хотя о свойствах связывания L1 с ионами Cu(II) также сообщалось ранее, нет информации о молекулярном механизме его антиоксидантной активности и его влиянии на индуцированную медью реакцию Фентона. Более того, механизм индуцированной медью реакции Фентона все еще обсуждается [37;134;135]. Поэтому для исследования редокс активности L1 в реакции Фентона с участием ионов меди в первую очередь было изучено комплексообразование L1 с Cu(II) [136].

Аналогично экспериментам, описанным в главе 3.1 были также получены оптические спектры L1 при различных концентрациях солей Cu(II) в воде (pH 4,5), ФБ (pH 7,4) а также EtOH с последующим расчетом констант равновесия и экстинкций комплексов по модели 2:1 (глава 2.3.5.2). Результаты расчетов представлены в Таблице 6:

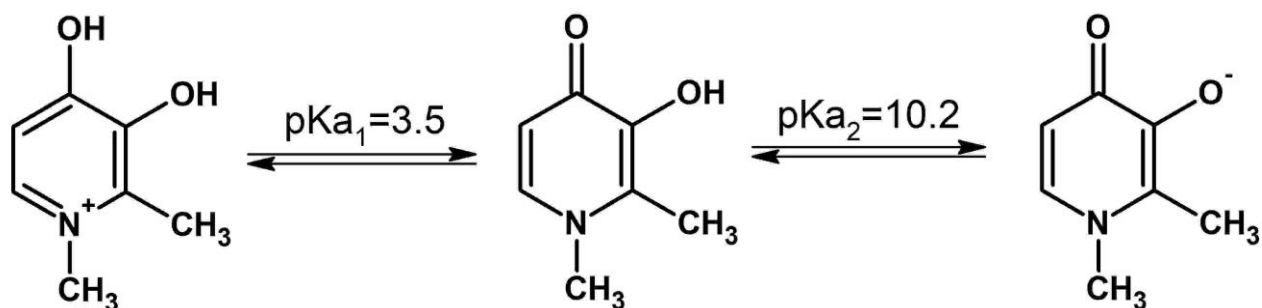
**Таблица 6** - Расчетные константы равновесия комплексов L1 с ионами Cu ( $M^{-1}$ ) и коэффициентов экстинкций ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) на 310 нм в различных растворителях

	$\epsilon_1$	$\epsilon_2$	$K_1$	$K_2$
L1 (0,1 мМ) + Cu(Ac) <sub>2</sub> ; H <sub>2</sub> O (pH 4.5)	5300±200	13950±170	800±40	2,3±0,9×10 <sup>5</sup>
L1 (10 мкМ) + Cu(Ac) <sub>2</sub> ; EtOH	9500±360	17000±80	(2,8±0,82)×10 <sup>6</sup>	(1,39±0,37)×10 <sup>7</sup>
L1 (0,1 мМ) + CuCl <sub>2</sub> ; ФБ (pH 7,4)	5600±250	11400±250	1300±350	(2,38±0,52)×10 <sup>6</sup>

По данным Нурчи с соавторами [10], при исследуемом pH=4,5 равновесие в растворе смещается в сторону комплекса  $[Cu^{II}L1]^+$  (1:1). Действительно, концентрационная зависимость выходит на насыщение при соотношении Cu:L1=1:1. В ФБ (pH 7,4) равновесие смещается в сторону комплекса  $[Cu^{II}L1_2]$  (1:2), что согласуется с данными [10]. Измерения в растворе EtOH также показывают, что концентрационная зависимость выходит на насыщение при соотношении Cu:L1=1:2.

Зависимость константы равновесия от pH также может быть связана с равновесием между протонированной и депротонированной формами L1 (Схема 10) [137]. Эти результаты также согласуются с литературными данными [132], где было показано, что комплексообразование ионов Cu(II) с L1 при высоких концентрациях (0—0,01 М) в водном растворе NaClO<sub>4</sub> (0,1 М) приводит преимущественно к образованию комплекса  $[Cu^{II}L1_2]$  в диапазоне pH 4-9. Однако при избытке Cu(II) при низких значениях pH образуются комплексы  $[Cu^{II}L1_2]$  и  $[Cu^{II}L1]^+$ . Лабильные комплексы меди  $[Cu^{II}L1]^+$ , в которых ион металла имеет возможность координировать с другими лигандами, способен инициировать

каскад редокс реакций с образованием АКР с последующим молекулярным, клеточным и тканевым повреждением. Такие лабильные комплексы металлов L1 могут образовываться в различных условиях, таких как низкая концентрация хелатора, низкое рН, присутствие других комплексообразующих лигандов и т.д. В данной работе не акцентировалось внимание на взаимодействии L1 с ионами  $\text{Cu}^+$ , так как при нейтральных значениях рН  $\text{Cu}^+$  быстро окисляется до  $\text{Cu}^{2+}$  в течение нескольких минут [72], поэтому комплексообразование  $\text{Cu}^+$  с различными органическими соединениями не обнаружено [138]. Дополнительное подтверждение окисления  $\text{Cu}^+$  до  $\text{Cu}^{2+}$  было зафиксировано методом ЭПР, что будет описано в главе 5.3.



**Схема 10.** Образование протонированной и депротонированной форм L1 в зависимости от рН раствора.

### 3.3. Заключение к главе

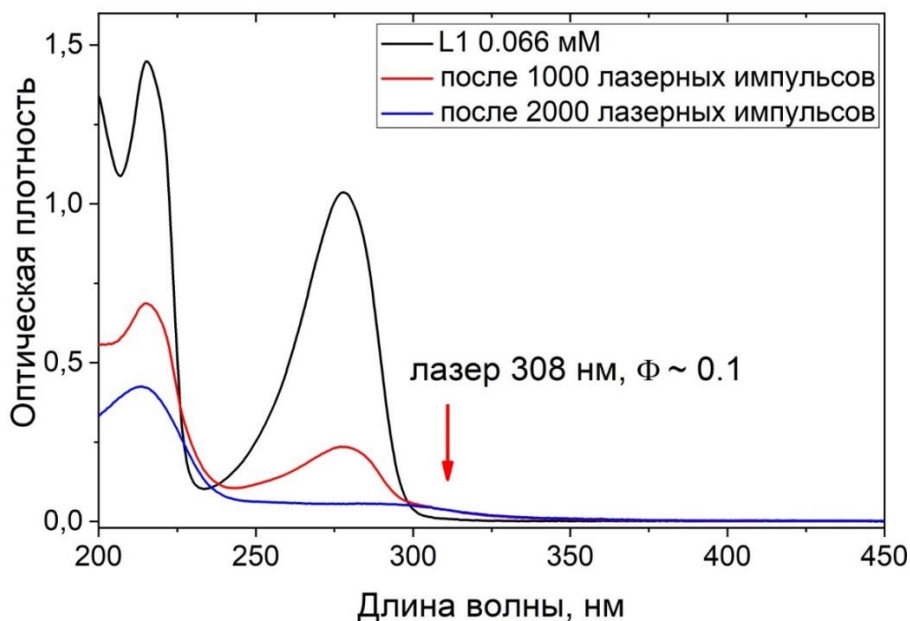
Рассчитаны стехиометрии, константы равновесия и экстинкции хелатных комплексов деферипрона с ионами  $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{Al(III)}$ ,  $\text{Zn(II)}$  и  $\text{Ca(II)}$  в различных условиях. Полученные данные соответствуют литературным относительно афинности деферипрона к различным металлам.

## Глава 4. ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕФЕРИПРОНА

Глава 4 посвящена исследованию фотохимических реакций с участием деферипрона, а также его комплексов с ионом трехвалентного железа и диамагнитными металлами в отсутствии и присутствии доноров и акцепторов электрона. Дополнительной задачей являлось установление структуры радикальных интермедиатов деферипрона и основных продуктов фотодеградации.

### 4.1. Фотодеградация деферипрона и его комплексов с ионами железа

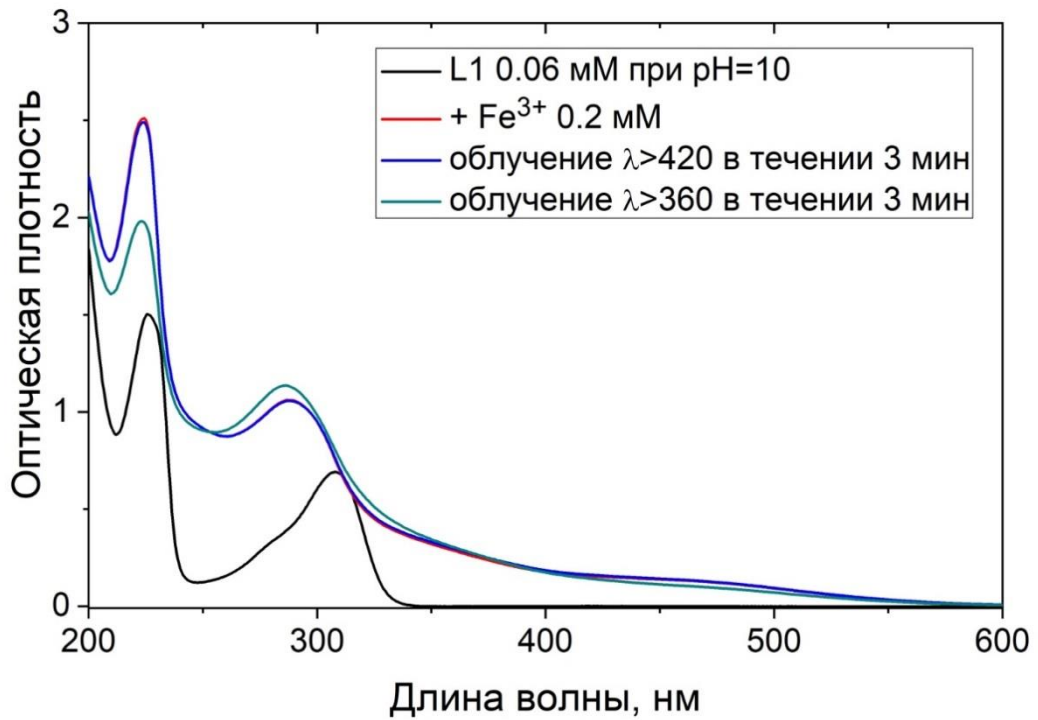
Первым этапом работы по изучению фотохимических свойств L1 являлось изучение его фотостабильности [139]. На Рисунке 8 показаны изменения в спектре поглощения L1 при облучении светом. Видно, что облучение раствора L1 лазером с длиной волны 308 нм или полным светом ртутной лампы приводит к быстрому разложению L1 с образованием продуктов, которые имеют низкие коэффициенты экстинкции ниже 300 нм, но более высокое поглощение при 308 нм (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Спектры поглощения водных растворов L1 (0,066 мМ, рН 5,5) до и после облучения лазером (308 нм). Эксперименты были проведены при комнатной температуре (25°C).

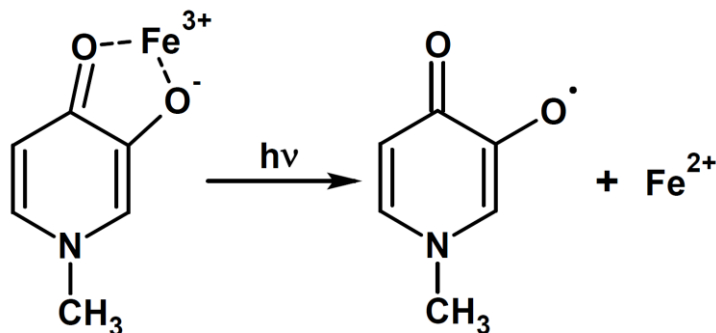
Квантовый выход фотодеградации L1 под действием лазерного излучения оценивался с использованием известной энергии лазерного импульса (20 мДж), начальной концентрации L1 (0,066 мМ), оптической плотности при 308 нм ( $\epsilon = 130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) и степенью засветки растворов L1, равной 50 и 100 лазерных импульсов (низкая степень фотодеградации). Расчетное значение квантового выхода составляет 0,1. Однако, учитывая, что продукты реакции имеют более высокое поглощение на 308 нм, чем L1, предполагается, что расчетный квантовый выход является нижней границей реального значения. Одним из возможных механизмов тушения возбужденного состояния свободной молекулы L1 может быть межмолекулярный перенос электрона между двумя молекулами L1. В настоящем исследовании электрон-акцепторная и электрон-донорная способности L1, а также возможные структуры продуктов были исследованы с использованием методов ЯМР и ХПЯ [139]. Роль кислорода в фотохимических реакциях с участием L1 будет описана в дальнейшем [139]. Ранее сообщалось, что аналогичные изменения в спектре поглощения наблюдались при фотолизе N-метил-4-пиридона [140]. К сожалению, авторам не удалось выделить и охарактеризовать продукты фотолиза с использованием различных физических и химических подходов.

В случае комплекса  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{L1})_3]$  облучение приводит к различным эффектам в зависимости от длины волны облучения [139]. Облучение УФ-светом ( $<320 \text{ нм}$ ) приводит к быстрому разложению комплекса железа с исчезновением полос поглощения в районе 460 нм и 280 нм. При фотолизе на длине волны 366 нм комплекс железа проявляет низкую фотохимическую активность. При облучении образца ртутной лампой в течение 3 мин приводило к небольшому снижению поглощения на 460 нм и росту поглощения на 360 и 260 нм за счет образования продуктов. В тоже время, комплекс  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{L1})_3]$  не проявляет фотохимической активности при облучении видимым светом с длиной волны  $>420 \text{ нм}$ . Рисунок 9 иллюстрирует эти эффекты при облучении водного раствора L1 при pH 10, где комплекс L1–Fe(III) существует только в форме  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{L1})_3]$ .



**Рисунок 9.** Спектры оптического поглощения водных растворов (рН 10) L1 (0,06 мМ) в отсутствии и присутствии  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  (0,2 мМ) а также спектры поглощения раствора после облучения светом ртутной лампы со светофильтрами, пропускающие свет выше 360 нм и 420 нм. Эксперименты были проведены при комнатной температуре ( $25^\circ\text{C}$ ).

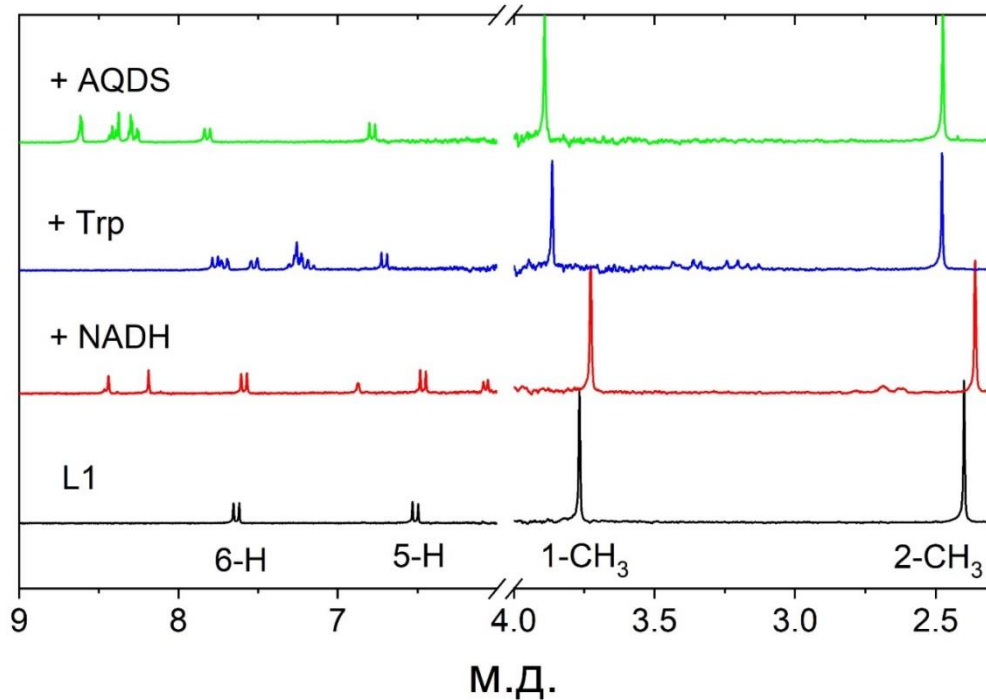
Поскольку существует ряд экспериментальных примеров внутримолекулярного переноса электрона в хелатных комплексах с  $\text{Fe}(\text{III})$  [89;141], было высказано предположение, что аналогичный механизм может реализовываться в комплексах L1– $\text{Fe}(\text{III})$  под действием УФ-излучения (Схема 11).



**Схема 11.** Предполагаемая реакция фотоиндуцированного внутрисферного переноса электрона с иона L1 на ион  $\text{Fe}(\text{III})$  с образованием  $\text{Fe}(\text{II})$  и нейтрального радикала L1.

#### 4.2. Фотохимическая активность деферипрона в присутствии акцептора электрона

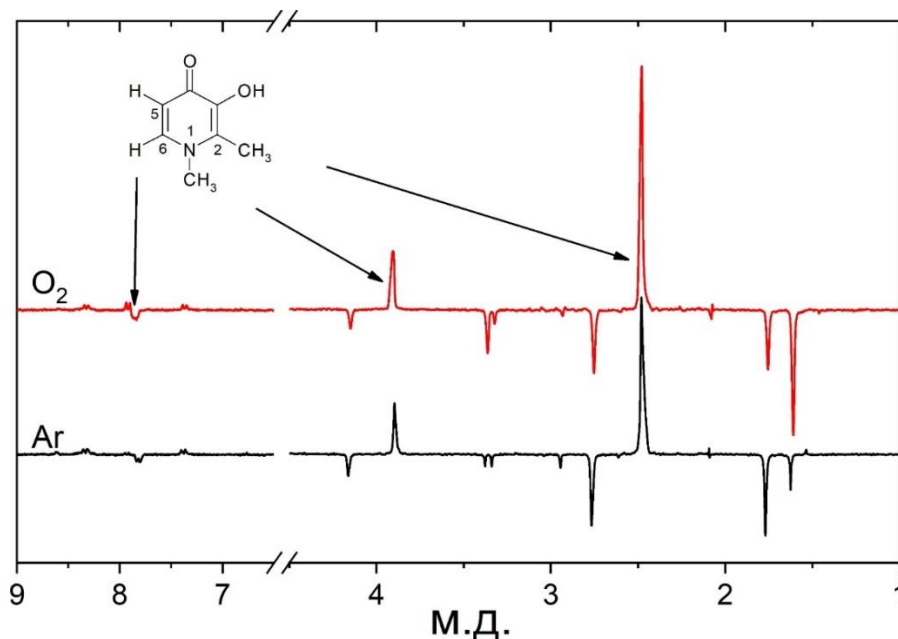
Следующим этапом работы по изучению фотохимических свойств L1 было исследование фоторадикальных процессов с использованием метода ХПЯ [139]. Эффекты ХПЯ были обнаружены при лазерном облучении L1 в присутствии доноров электрона (NADH, Trp) и акцепторов электрона дихлорбензохинона и AQDS, а также в отсутствие каких-либо дополнительных веществ. Наличие сигналов ХПЯ указывает на образование свободных радикалов (нейтральных радикалов или ион-радикалов) при УФ-облучении водного раствора L1 [139]. Следует отметить, что положение линий в L1 спектре ЯМР в подкисленном ФБ (pH 5) в присутствии NADH, Trp или хинона AQDS значительно смещено по сравнению с чистым соединением (Рисунок 10).



**Рисунок 10.** Фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров растворов L1 (2 мМ) в ФБ  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 5) в отсутствие и присутствии доноров электрона Trp и NADH (2 мМ) и акцептора электрона AQDS (2 мМ). Температурные условия экспериментов: 25 °С.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Данный эффект может быть обусловлен специфическим взаимодействием L1 с этими молекулами.

Электрон-донорная способность L1 в фотохимических реакциях была исследована в присутствии акцепторов электронов, таких как дихлорбензохинон и AQDS [139]. Поляризация наблюдалась только полярных средах: вода (AQDS), а также метанол и ацетонитрил (дихлорбензохинон), но не наблюдалась в бензоле (дихлорбензохинон). Этот факт указывает на перенос электрона как на ключевой этап реакции. В качестве примера на Рисунке 11 показаны фрагменты ХПЯ спектров, обнаруженных при облучении L1 в присутствии AQDS.

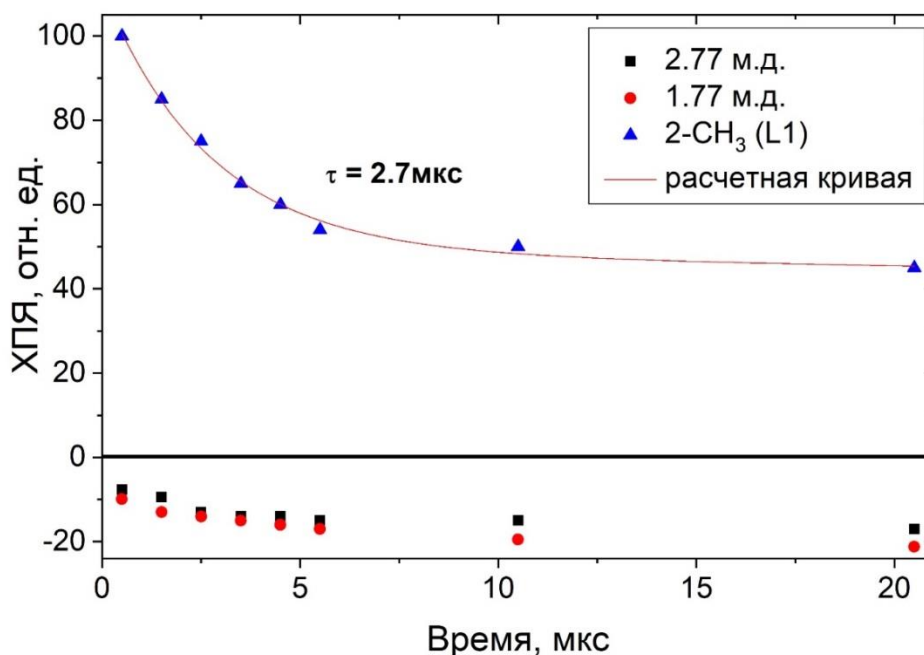


**Рисунок 11.** Фрагменты  $^1\text{H}$  ХПЯ спектров, зарегистрированные после лазерного облучения раствора L1 (2 мМ) в ФБ  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 5) в присутствии AQDS (2 мМ), предварительно продутые кислородом и аргоном. Температурные условия экспериментов: 25 °С.  $^1\text{H}$  квазистационарные ХПЯ спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Поляризация наблюдалась для исходного L1: 6-Н (эмиссия (E) на 7,82 м.д., 1- $\text{CH}_3$  (абсорбция (A) на 3,90 м.д.) и 2- $\text{CH}_3$  (A на 2,48 м.д.), а также для продуктов реакции, поляризованных с противоположным знаком (Рисунок 11). Основные поляризованные линии продуктов представляют собой группы 2- $\text{CH}_3$  (эмиссия на 1,77 и 2,77 м.д.) с равной интенсивностью. При анализе спектров ХПЯ важно отметить, что L1 и продукты фотохимической реакции имеют противоположные знаки поляризации, однако одинаковое соотношение интенсивностей сигналов ХПЯ для СН протонов и двух метильных групп ( $I(6\text{-H}):I(1\text{-CH}_3):I(2\text{-CH}_3)=1:2,5:9,3$ ). Обычно это означает образование поляризованного исходного



соединения за счет обратного переноса электрона и образование поляризованных продуктов из той же радикальной пары во вторичных процессах в растворе. Для подтверждения этого предположения был проведен эксперимент ХПЯ с временным разрешением, на основании результатов которого были построены изменения интенсивностей сигналов  $\text{CH}_3$  групп исходного L1, а также продуктов фотохимической реакции (Рисунок 12).

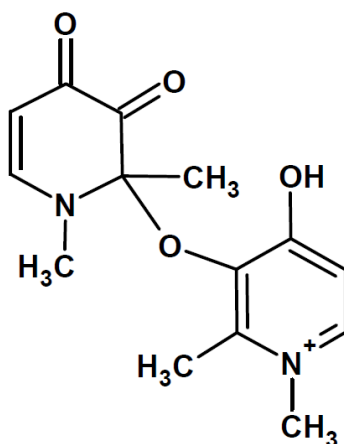


**Рисунок 12.** Изменение относительной интенсивности сигналов времяразрешенного  $^1\text{H}$  ХПЯ от  $2\text{-CH}_3$  протонов исходного L1 и продуктов фотохимической реакции L1 (2 мМ) и AQDS (2 мМ), измеренные при различных временных задержках после лазерного импульса. За максимум сигнала взята интегральная интенсивность  $2\text{-CH}_3$ . L1 сигнала при задержке 0,5 мкс. Эксперименты были проведены в ФБ  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 5). Температурные условия экспериментов: 25 °С.  $^1\text{H}$  времяразрешенные ХПЯ спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Видно уменьшение интенсивности сигналов от геминальной поляризации L1 с одновременным ростом эмиссионных сигналов продуктов реакции, образующихся за счет реакции радикалов, выходящих из геминальной пары в раствор. Характерное время образования продуктов и других радикальных процессов в растворе составляет несколько микросекунд. Следует отметить, что поляризации двух метильных групп ( $2\text{-CH}_3$  на 1,77 и 2,77 м.д.) имеют одинаковую зависимость от времени.

Однако после фотолиза в спектре ЯМР не было обнаружено никаких продуктов на соответствующем положении химсдвигов. С другой стороны,

облученный образец поменял цвет с бесцветного на желтый, линии L1 в конечном спектре ЯМР показывают значительное уширение. Положение линий в спектре ХПЯ точно соответствует спектру ЯМР продуктов реакции, поэтому существует возможность выяснить структуру продуктов, даже если они образованы в очень низкой (недетектируемой) концентрации. Принимая во внимание, что основные поляризованные линии продуктов на Рисунке 11 (2-CH<sub>3</sub> на 1,77 и 2,77 м.д.) имеют равные интенсивности и одинаковые временные профили, можно предположить, что эти линии принадлежат одному продукту, который состоит из двух фрагментов L1. На основании анализа спектров ЯМР и ХПЯ, а также расчетов с использованием программы моделирования ЯМР спектров ACDLabs соавторами [139], была предложена структура основного продукта (Продукт 1) (Рисунок 13).

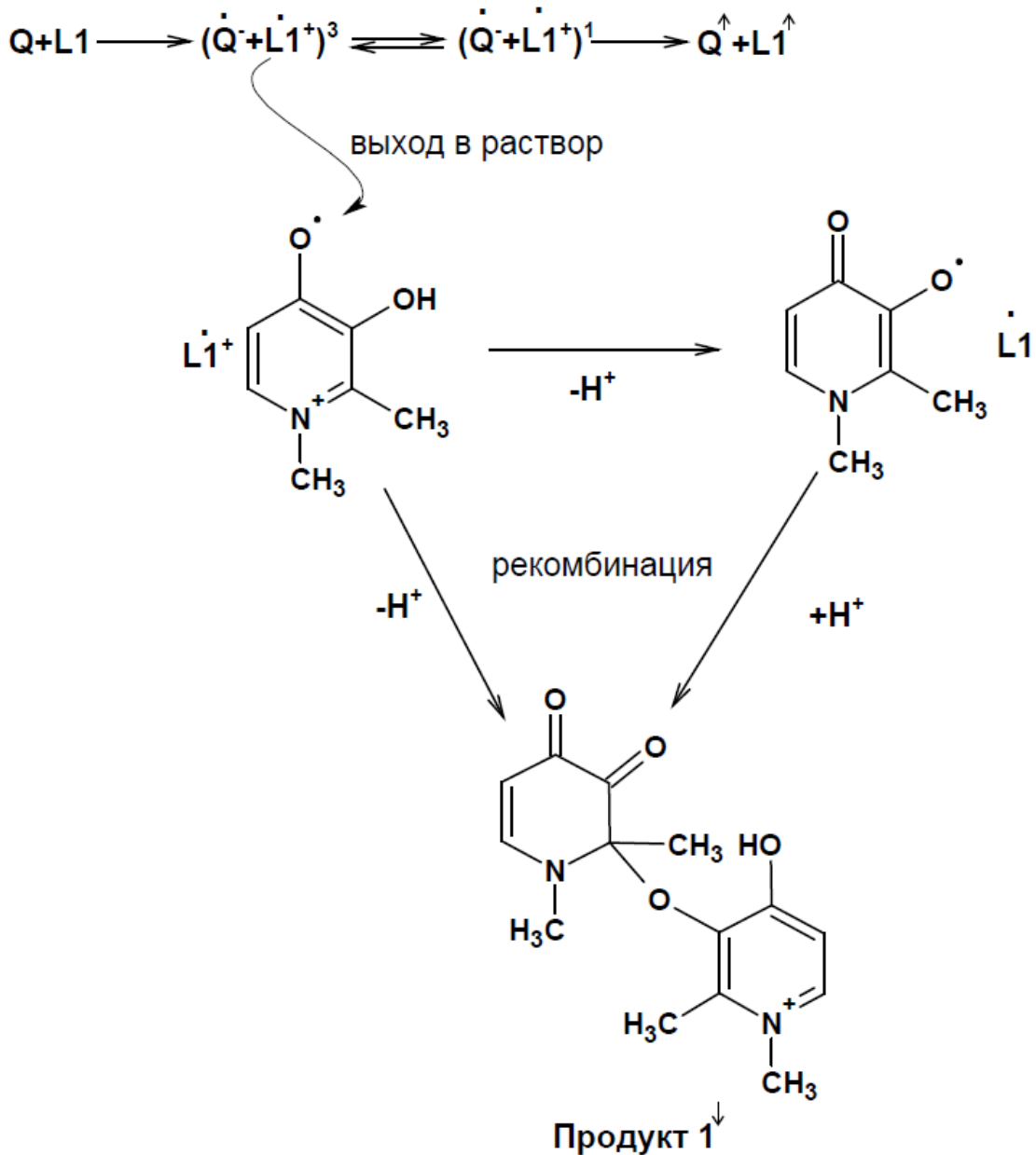


**Продукт 1**

**Рисунок 13.** Структура продукта 1: 3-(1,2-диметил-3,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиридин-2-илокси)-4-гидрокси-1,2-диметилпиридин, предложенный из анализа спектров ЯМР и ХПЯ, а также расчетов с использованием программы ACDLabs.

Сигналы на 4,16 и 2,77 м.д. соответствуют метильным протонам N-CH<sub>3</sub> и 2-CH<sub>3</sub> нижнего пиридинового кольца соответственно. Данный химический сдвиг в сторону низкого поля относительно исходного L1 (3,90 м.д. (N-CH<sub>3</sub>) и 2,48 м.д. (2-CH<sub>3</sub>)) обусловлен наличием положительного заряда на азоте. Структура левой части определяется сильнопольным сдвигом метильных протонов (2,94 и 1,77 м.д.) относительно исходного L1. Этот нестабильный промежуточный продукт может быть образован путем рекомбинации двух катион-радикалов (с

последующим депротонированием) или двух нейтральных радикалов (с последующим протонированием). На Схеме 12 показан механизм фототрансформации L1 в присутствии акцепторов электронов, предложенный на основе анализа данных ЯМР и ХПЯ. Первым шагом реакции является перенос электрона от L1 к акцептору с последующим переносом протона. Следует отметить, что обратный перенос электрона в ион-радикальной паре приводит к поляризованным исходным соединениям (отмечено  $\uparrow$ ). Поляризованный продукт реакции образуется во вторичных реакциях в растворе (отмечено  $\downarrow$ ).



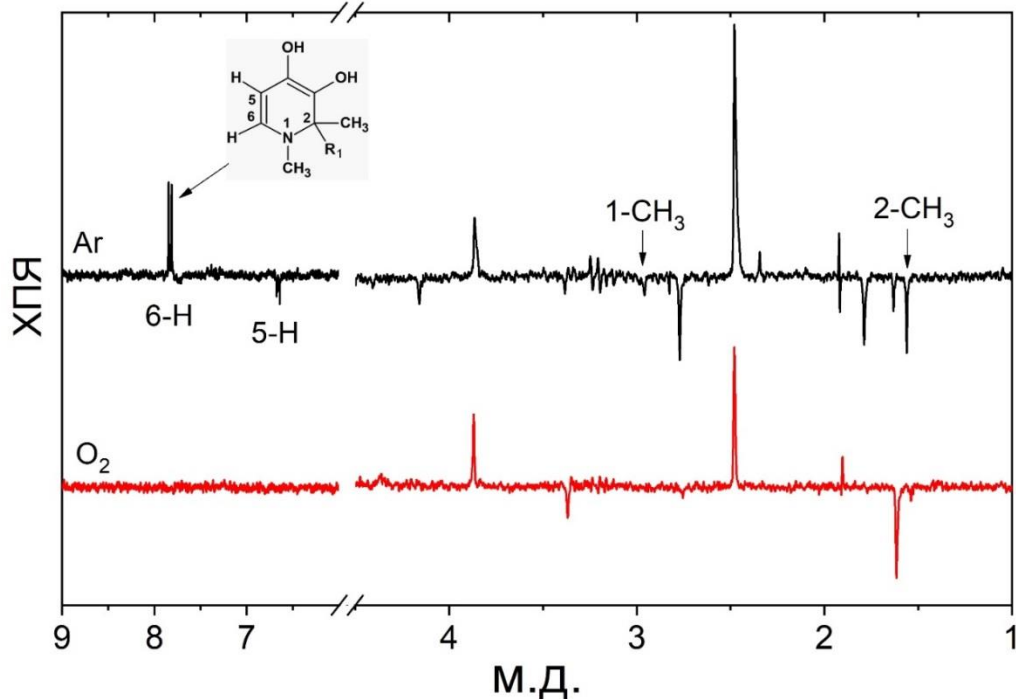
**Схема 12.** Механизм реакции взаимодействия L1 с акцепторами электрона. Поляризованные продукты реакции отмечены  $\uparrow$  и  $\downarrow$ .

Как упоминалось выше, после фотолиза стабильных продуктов не обнаружено. По этой причине нам не удалось идентифицировать конечные продукты этой реакции. Причиной может быть нестабильность промежуточного продукта 1 и образование полимерных структур, как в случае фотолиза N-метил-4-пиридона [140]. Важно, что поляризованный продукт 1 был обнаружен как в квазистационарном, так и во время разрешенном эксперименте. Это означает, что данное соединение распадается в термической реакции, но не за счет фотолиза. Интенсивность поляризованных линий продукта составляет около 80% от поляризации L1. Учитывая ядерную релаксацию в радикалах, это означает, что димеризация радикалов L1 является основным путем их распада в этой реакции. При продувании раствора кислородом (вместо аргона, как описано выше), наблюдалось небольшое увеличение поляризации L1 (в 1,4 раза), но интенсивность поляризации продукта 1 снижалась (Рисунок 11). Одновременно новый поляризованный продукт (продукт 2) появился в спектре на 3,38 м.д. (N-CH<sub>3</sub>) и 1,62 м.д. (2-CH<sub>3</sub>) с тем же соотношением I(N-CH<sub>3</sub>) и I(2-CH<sub>3</sub>). Как и в предыдущем случае, после фотолиза стабильные продукты не накапливались. Предполагается, что данный продукт фотолиза L1 (продукт 2) образуется в присутствии O<sub>2</sub>. Отношение интенсивностей поляризации I(продукт 2)/I(продукт 1)=2. К сожалению, структуру продукта 2 установить не удалось. Таким образом, можно сделать вывод, что присутствие кислорода не влияет на первичные фотохимические процессы, но влияет на путь распада радикалов, вышедших из геминальной пары в раствор. Увеличение поляризации L1 можно объяснить уменьшением вклада реакции обмена между L1 и его катион-радикалом (или нейтральным радикалом).

#### **4.3. Фотохимическая активность деферипрона в присутствии донора электрона**

Помимо исследования фотохимической реакции L1 с акцепторами электрона было проведено исследование фотохимического взаимодействия L1 с

донорами электрона [139]. Эффекты ХПЯ были обнаружены при облучении раствора L1 в присутствии доноров электронов, NADH и Trp. В качестве примера на Рисунке 14 показаны фрагменты спектра ХПЯ, обнаруженного при УФ-облучении L1 в присутствии Trp в ФБ (рН 5).



**Рисунок 14.** Фрагменты  $^1\text{H}$  спектров ХПЯ, зарегистрированные после лазерного облучения L1 в растворе ФБ  $\text{D}_2\text{O}$  (рН 5) в присутствии Trp. Растворы предварительно продуты кислородом (красный) и аргоном (черный). Температурные условия экспериментов:  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  квазистационарные ХПЯ спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Подобные эффекты были обнаружены и при рН 7. В случае раствора, предварительно продутого аргоном, поляризация наблюдалась для L1 (6-H (E), 1- $\text{CH}_3$  (A) и 2- $\text{CH}_3$  (A)) и для продуктов реакции (адсорбционные сигналы на  $-\text{CH}_3$  группах, Рисунок 14). Подобно ранее обсуждавшейся реакции с хиноном, один поляризованный продукт имеет димерную структуру (1- $\text{CH}_3$  (E) на 4,16 и 2,94 м.д.; 2- $\text{CH}_3$  (E) при 2,77 и 1,78 м.д.). Данная поляризация на продукте формируется в этой же радикальной паре. С учетом относительной интенсивности и знака поляризованных линий предложены следующие структуры радикальных интермедиатов L1, образующихся при облучении в присутствии доноров электронов (Схема 13): распределение интенсивностей ХПЯ исходного L1

соответствует распределению СТВ констант в нейтральном радикале пиридинов, по структуре подобных L1 [142].

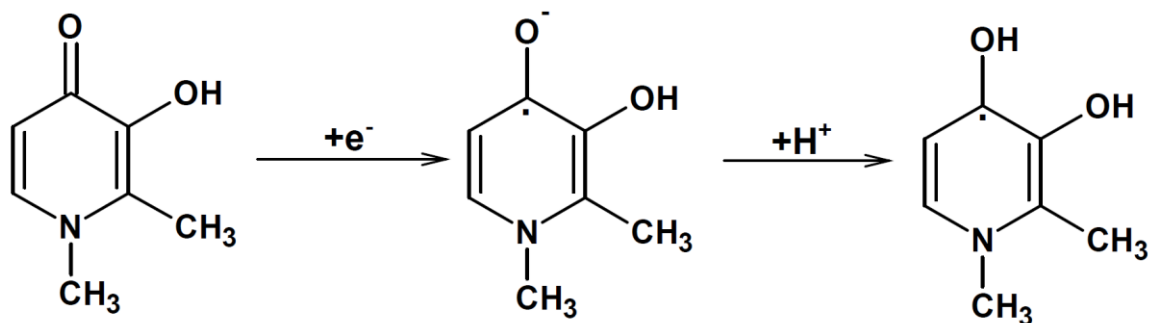
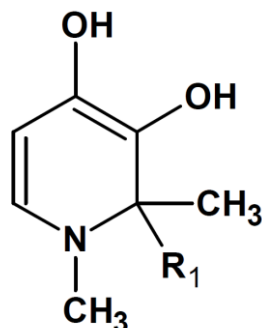


Схема 13. Структуры анион, катион и нейтрального радикалов L1.

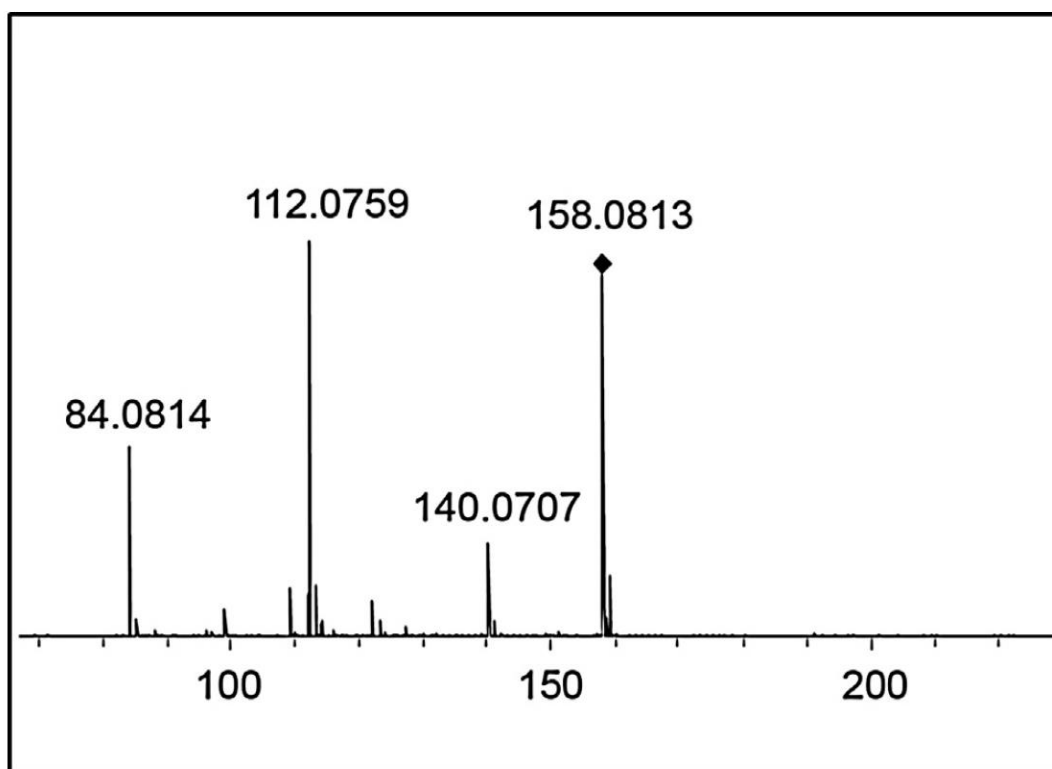
Первым этапом реакции является перенос электрона к молекуле L1 с последующим переносом протона. Следует отметить, что обратный перенос протона в радикальной паре приводит к поляризованным исходным соединениям. Поляризованные продукты реакции образуются во вторичных реакциях в растворе. При рН 5 поляризация протонов Trp не наблюдалась, но она проявляется в растворах с более высоким рН. Однако, как и в случае реакции с хиноном, поляризованный продукт нестабилен и не обнаруживается в спектре ЯМР. Спектр ЯМР реакционной смеси после фотолиза показывает только один, наиболее стабильный продукт (продукт 3), сигналы от водородов которого соответствуют линиям на 2,81 м.д. (1-CH<sub>3</sub>), 1,56 м.д. (2-CH<sub>3</sub>), 6,66 м.д. (5-H) и 7,83 м.д. (6-H). Сдвиг сигнала от 2-CH<sub>3</sub> в сильное поле означает отсутствие двойной связи C2=C3 в этом продукте (Рисунок 15).



Продукт 3

Рисунок 15. Структура предполагаемого основного продукта фотолиза L1 с донором электрона.

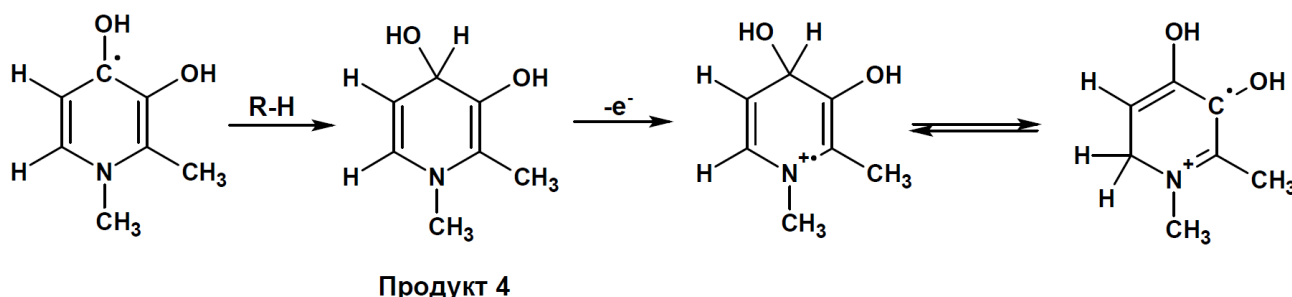
Для дополнительного подтверждения структуры продукта фотолиза L1 в присутствии доноров электрона нашими соавторами [139] был проведен масс-спектрометрический анализ (МС-анализ) раствора после фотолиза. МС-анализ реакционной смеси подтвердил, что продукт 3 является основным продуктом фототрансформации L1 в присутствии доноров электронов (Рисунок 16).



**Рисунок 16.** Масс-спектр продуктов реакции после облучения L1 в присутствии Tgr в H<sub>2</sub>O [139].

Сигнал с  $m/z=140$  исходит от молекулярного иона L1, а продукт реакции имеет  $m/z=158$ . Это означает, что R<sub>1</sub> является группой OH. Сходный набор продуктов аддуктов и димеров OH обнаружен Саломатовой с соавт. [143], образующихся из катион-радикалов фенольных производных после их облучения в водном растворе. Интенсивности поляризации этого продукта отличаются от поляризованного промежуточного димерного продукта и исходного L1:  $I(6\text{-H}):I(5\text{-H}):I(1\text{-CH}_3):I(2\text{-CH}_3)=1:0,3:0:0,6$ . Это соотношение для L1 равно  $I(6\text{-H}):I(5\text{-H}):I(1\text{-CH}_3):I(2\text{-CH}_3)=1:0:6,5:22,6$ . Это означает, что поляризация этого продукта не является производной исходной радикальной пары, а возникает во вторичных

процессах. Предполагается, что наблюдаемые для продукта 3 эффекты ХПЯ образуются в катионе-радикале дигидропиридина, производном от промежуточного продукта 4 (Схема 14).

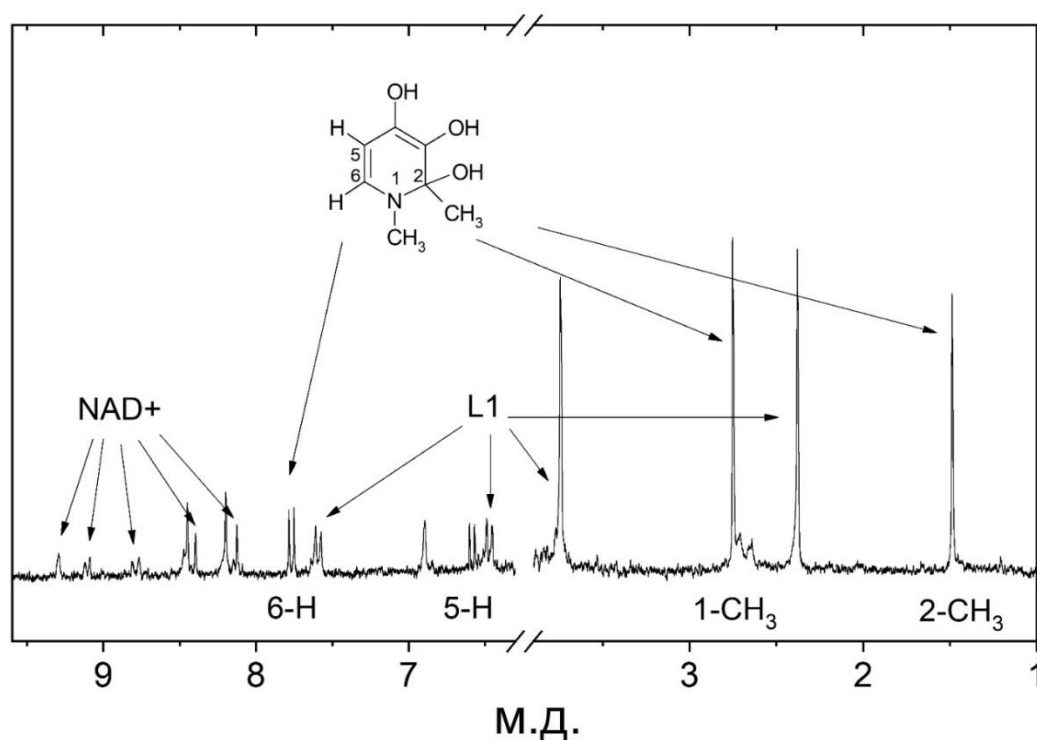


**Схема 14.** Образование первичных и вторичных радикальных интермедиатов L1 в фотохимической реакции с донором электрона.

Дигидропиридины имеют гораздо более высокий коэффициент экстинкции при 308 нм, чем L1, поэтому этот продукт не накапливается во время реакции, а подвергается дальнейшей трансформации. Катион-радикалы дигидропиридина имеют значительные константы СТВ в положении 4-Н (~50 Гс), и этот протон может претерпевать 1–3 сигматропный сдвиг (Схема 14) [144]. Это приводит к преобладающей поляризации протонов 6-Н конечного продукта. Аналогичный эффект переноса поляризации был обнаружен в более ранних исследованиях [144]. Присутствие кислорода приводит к снижению интенсивности поляризации L1 и полному исчезновению поляризованных линий продуктов реакций в F-парах, обнаруживаемых в насыщенном аргоном растворе (Рисунок 14). Вместо этого поляризация продукта 2 проявлялась в спектре ХПЯ на 3,36 м.д. (N-CH<sub>3</sub>) и 1,62 м.д. (2-CH<sub>3</sub>) с тем же отношением I(N-CH<sub>3</sub>)/I(2-CH<sub>3</sub>). Выход продукта 3 в присутствии кислорода уменьшился в 3,5 раза. Это предполагает, что растворенный кислород не ответственен за образование гидроксированного продукта в реакции фотодегградации L1. Эффекты ХПЯ были также обнаружены во время фотолиза в присутствии другого донора электронов, а именно NADH. Спектр ХПЯ показывает только слабую поляризацию 4-Н протонов NADH (E) и его продукта NAD<sup>+</sup> (A). В этом случае не наблюдались поляризованные интермедиаты L1, и единственным продуктом реакции из L1 является продукт 3. Поскольку интенсивность ХПЯ пропорциональна значению константы СТВ в



радикале-предшественнике, отсутствие поляризации L1 может быть связано с небольшой константой СТВ в радикале L1 (<10 Гс) по сравнению с катионом-радикалом NADH (~50 Гс [144;145]) и слабой интенсивности сигналов ХПЯ в этой реакции. Эффекты ХПЯ на NADH и NAD<sup>+</sup> были аналогичны тем, которые наблюдал ранее Каптейн в реакции NADH с флавином [146]. Количество NAD<sup>+</sup>, обнаруженное после фотолиза, составляет половину от количества продукта 3 (Рисунок 17).

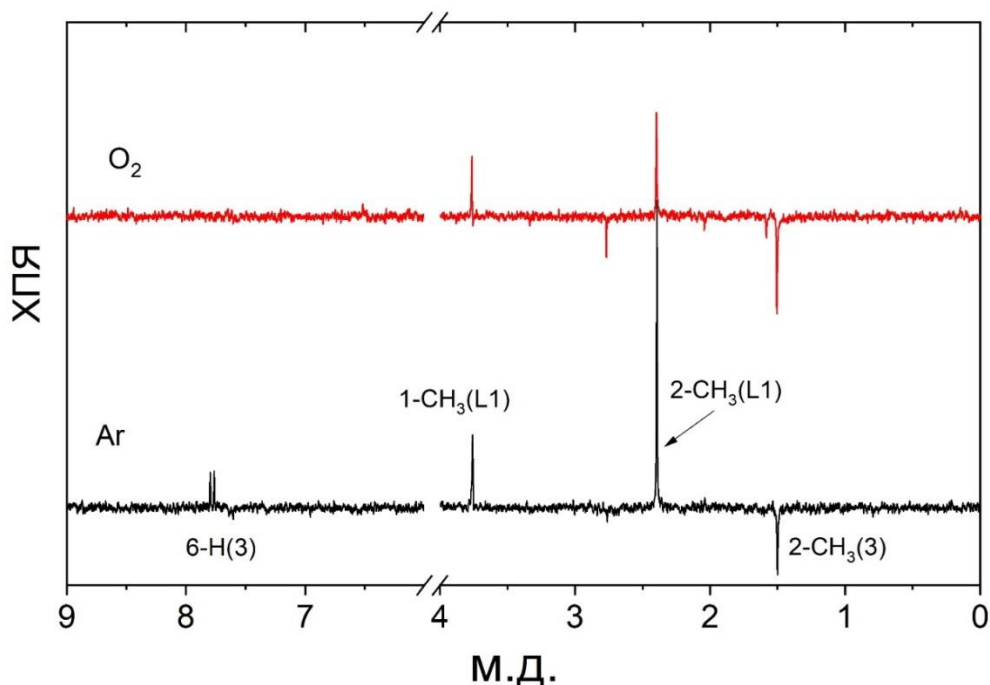


**Рисунок 17.** Фрагменты <sup>1</sup>H ЯМР спектра, зарегистрированного после лазерного облучения раствора L1 (5 мМ) в ФБ D<sub>2</sub>O (рН 5) в присутствии NADH (2 мМ). Все эксперименты были проведены при комнатной температуре (25 °С). <sup>1</sup>H ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Этот факт согласуется с ранее обнаруженным, что N-замещенные дигидропиридины (в том числе NADH) подвергаются двухэлектронному окислению в присутствии акцепторов электронов [146]. Присутствие кислорода приводит к уменьшению общей интенсивности поляризации, и выход продуктов увеличивается примерно вдвое по сравнению, когда эксперимент проводят в растворе, насыщенном аргоном. В тоже время слабая поляризация продукта 2 появилась в спектре ХПЯ: эмиссионный сигнал на 3,38 м.д. (N-CH<sub>3</sub>) и 1,62 м.д. (2-CH<sub>3</sub>).

#### 4.4. Фотохимическая активность чистого деферипрона

На основании предыдущих исследований по фотохимической активности L1 можно сделать вывод, что хелатор обладает как электрон-донорными, так и электрон-акцепторными свойствами, поэтому возник вопрос о механизме фотохимической активности чистого L1 в отсутствие других доноров или акцепторов электрона. Хотя L1 имеет очень низкое поглощение при 308 нм ( $\epsilon=130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), эффекты ХПЯ были также обнаружены во время его лазерного фотолиза в отсутствие каких-либо добавок (A на 1-CH<sub>3</sub> и 2-CH<sub>3</sub> группах L1, Рисунок 18) [139].



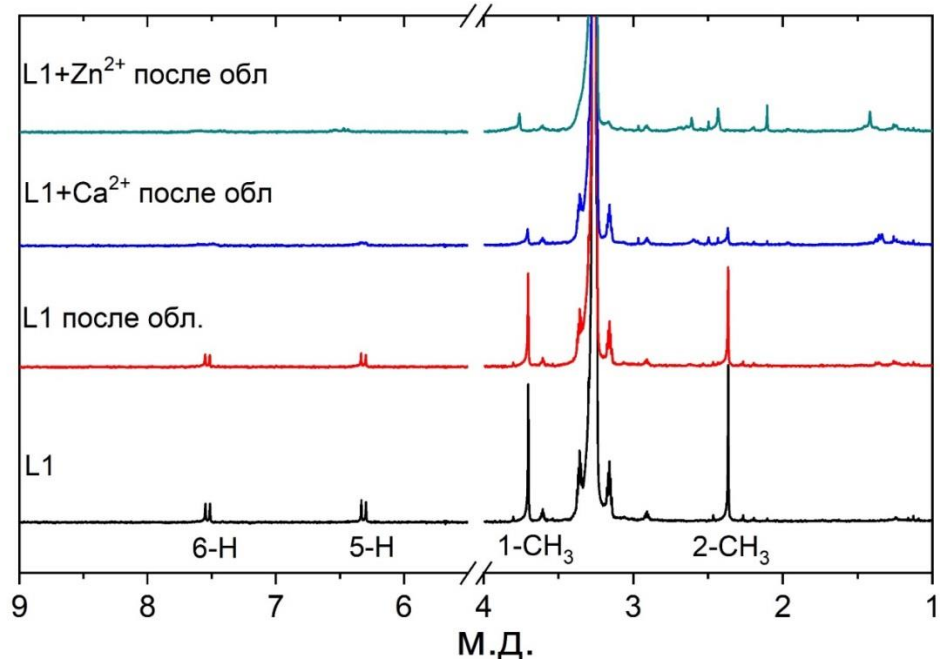
**Рисунок 18.** Фрагменты <sup>1</sup>H спектров ХПЯ, зарегистрированные после лазерного облучения раствора L1 в ФБ D<sub>2</sub>O (pH 5), предварительно продутых растворов аргоном (черный) и кислородом (красный). Сигналы от протонов продукта 3 обозначены (3). Температурные условия экспериментов: 25 °С. <sup>1</sup>H квазистационарные ХПЯ спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Исходя из того, что L1 является бифункциональной молекулой и демонстрирует как электрон-донорные, так и электрон-акцепторные способности, можно предположить, что механизм фототрансформации может включать перенос электрона между двумя молекулами L1. Поскольку в этом случае образуются как анион-радикал, так и катион-радикал L1, можно ожидать

образования того же набора продуктов, что и в предыдущих случаях. Однако после облучения в отсутствие кислорода в спектрах ХПЯ и ЯМР обнаружен только продукт 3. Подобно ранее описанной реакции с Trp, поляризация продукта 3 образуется во вторичной радикальной паре ( $a(6-H) \gg a(2-CH_3)$ ) в отличие от первичных радикалов L1 ( $a(6-H) \ll a(2-CH_3)$ ), как это видно на Рисунках 14 и 18. Следует отметить, что образование аддукта 2-ОН наблюдали также Shim и Hammond при облучении N-метил-4-пиридонов [140]. Присутствие кислорода приводит к уменьшению интенсивности поляризации L1 и изменению интенсивности поляризации продуктов 3 ( $a(6-H) \ll a(2-CH_3)$ ). В тоже время в спектре ХПЯ появилась слабая поляризация продукта 2. Предполагается, что триpletные геминальная и диффузионная ион-радикальные пары могут вносить вклад в общую поляризацию L1 и, соответственно, в уменьшение интенсивности ХПЯ в присутствии кислорода может быть связано с ингибированием образования диффузионной ион-радикальной пары. В целом можно сделать вывод, что присутствие кислорода ингибирует эффекты ХПЯ на L1, образующиеся во вторичных радикальных процессах в растворе.

#### **4.5. Влияние диамагнитных металлов на фотоокисление деферипрона в реакциях с участием донора электрона**

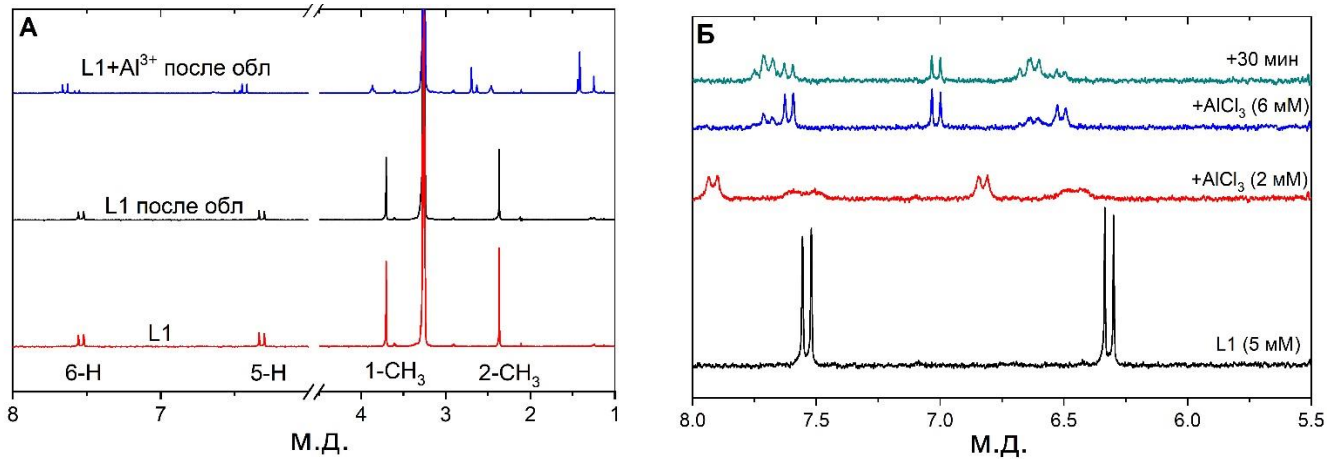
Для более подробного изучения влияния хелатирования на фотохимические свойства L1 был проведен ряд ЯМР и ХПЯ экспериментов с участием комплексов L1 с ионами диамагнитных металлов, таких как Zn, Ca и Al. На Рисунке 19 представлены спектры ЯМР чистого L1, его продуктов фоторазложения, а также продуктов фоторазложения в присутствии ионов Zn и Ca.



**Рисунок 19.** Фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров растворов L1 (5 мМ) в водно-спиртовом (50%  $\text{D}_2\text{O}$ , 50%  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) до и после облучения (256 лазерных импульсов) в отсутствии и присутствии  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{ZnCl}_2$  (5 мМ). Температурные условия экспериментов: 25 °С.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

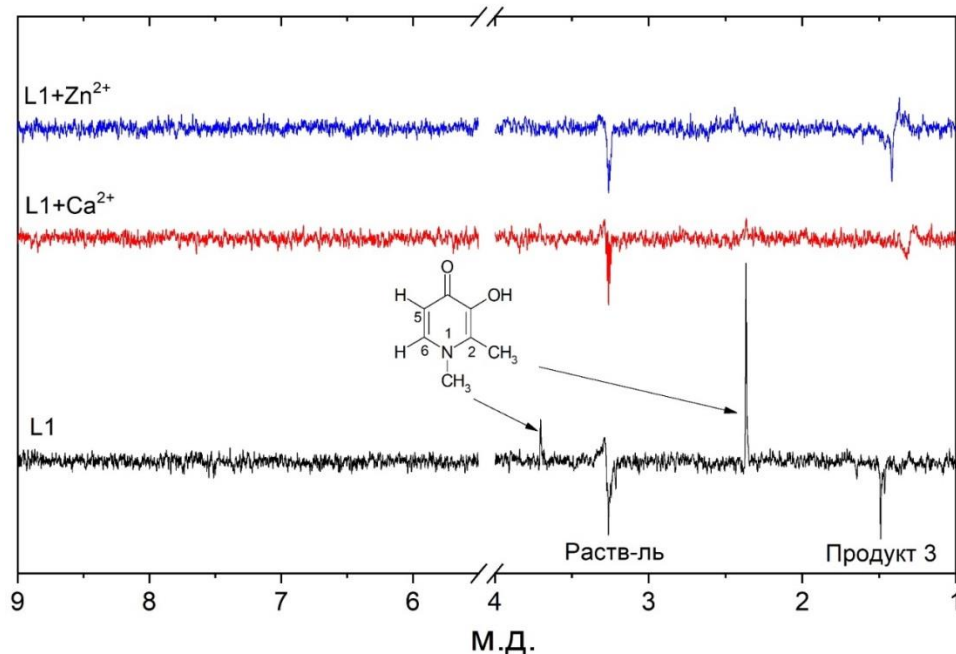
Видно, что скорость фотодеградаци, а также суммарный выход продуктов существенно увеличивается в присутствии ионов металлов. Поскольку ранее было показано, что фотохимическая реакция может происходить между двумя молекулами L1, увеличение выхода продукта реакции при облучении хелатных комплексов по сравнению с чистым L1 может быть связано как с близким расположением двух молекул в комплексе, так и с увеличением оптической плотности раствора L1 в присутствии ионов металлов (см. Таблицу 5).

Аналогичная ситуация наблюдается в присутствии ионов Al (Рисунок 20). Также из наличия нескольких сигналов в спектре ЯМР, соответствующих одной и той же группе протонов, можно сделать вывод о присутствии в растворе хелатных комплексов различной стехиометрии. Для иллюстрации на Рисунке 20Б приведен фрагмент спектра ЯМР, на котором видно наличие нескольких линий 6-Н и 5-Н закомплексованного L1, соответствующего разным стехиометриям комплекса L1-Al. Наблюдается медленное изменение спектра со временем. Этот факт согласуется с оптическими измерениями, в которых установление равновесия в данной системе наблюдалось в течение суток.



**Рисунок 20. А:** Фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров растворов L1 (5 мМ) в водно-спиртовом (50%  $\text{D}_2\text{O}$ , 50%  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) до и после облучения (256 лазерных импульсов) в отсутствие и присутствии  $\text{AlCl}_3$  (5 мМ). **Б:** Фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров растворов L1 (5 мМ) в водно-спиртовом (50%  $\text{D}_2\text{O}$ , 50%  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) в отсутствие и присутствии различных концентраций  $\text{AlCl}_3$  (2 мМ; 6 мМ) и через 30 мин после добавления  $\text{AlCl}_3$  (6 мМ) в раствор. Температурные условия экспериментов:  $25^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Помимо ЯМР экспериментов также были проведены эксперименты ХПЯ для изучения фотохимической активности закомплексованных молекул L1. На Рисунке 21 представлены фрагменты спектров ХПЯ чистого L1 5 мМ, а также в присутствии ионов Zn, Ca.



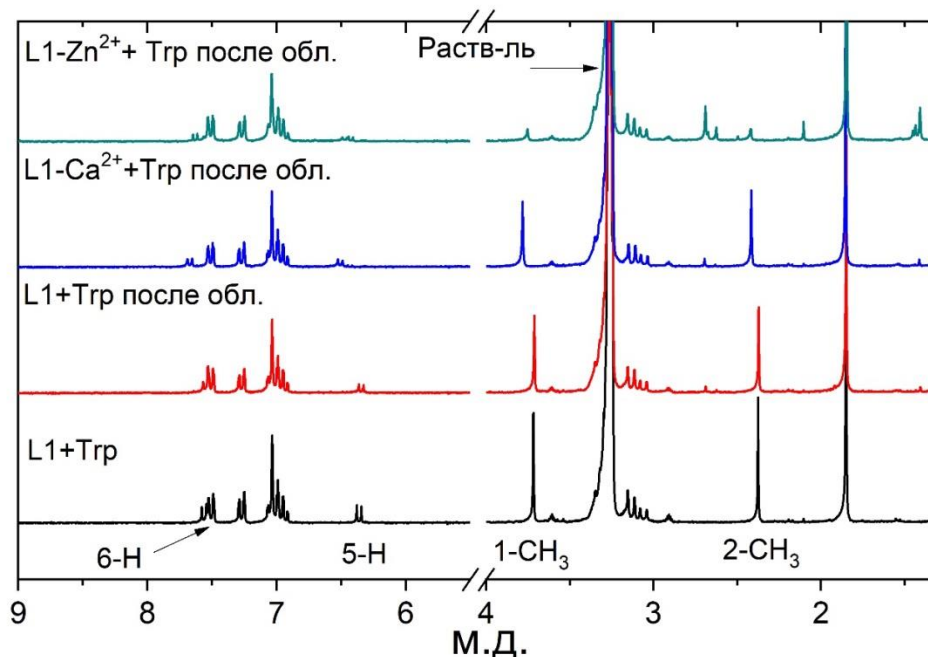
**Рисунок 21.** Фрагменты  $^1\text{H}$  ХПЯ спектров L1 (5 мМ) в водно-спиртовом растворе (50%  $\text{D}_2\text{O}$ , 50%  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) в отсутствие и присутствии солей  $\text{ZnCl}_2$  и  $\text{CaCl}_2$  (5 мМ). Температурные условия экспериментов:  $25^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  квазистационарные ХПЯ спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Наиболее заметным эффектом является исчезновение поляризации L1 в присутствии ионов металла, что указывает на отсутствие обратимости реакции в комплексе. Аналогичный эффект наблюдался и в присутствии ионов алюминия.

Как уже было показано, реакция идет по механизму, включающему перенос электрона между молекулами L1 в возбужденном и в основном состояниях с образованием катион и анион радикалов:

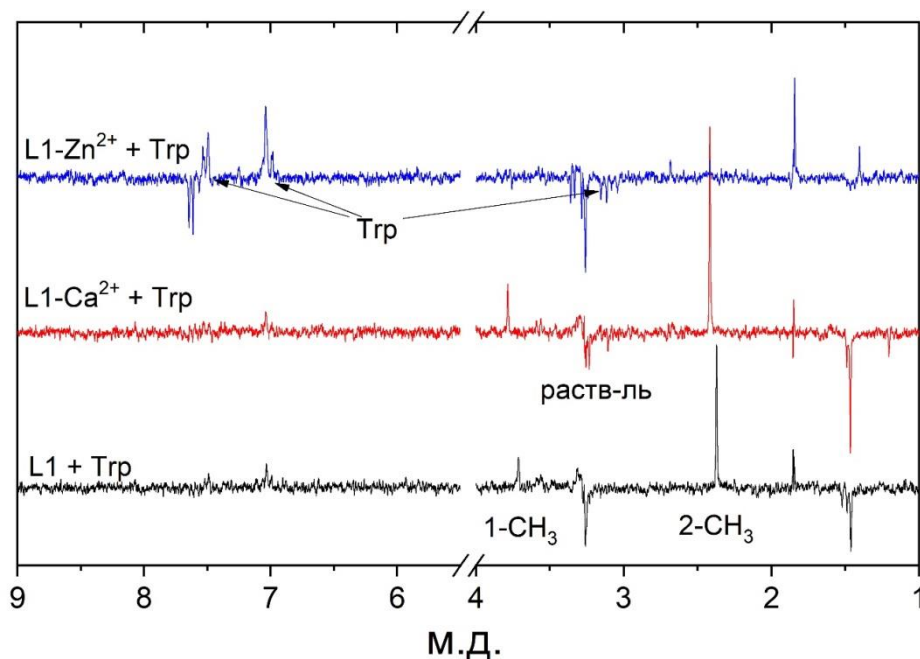
Поляризованный L1 образуется в результате обратного переноса электрона в результате негеминальных реакций радикалов в растворе. Исходя из спектров ЯМР и ХПЯ, полученных в результате фотохимических экспериментов с хелатными комплексами L1-Ca, L1-Zn, L1-Al, а также чистого L1 (см. главу 4.4), показано, что в результате радикальных реакций образуется стабильный фотопродукт (Продукт 3, Рисунок 15).

Следующим этапом работы являлось исследование фотохимического взаимодействия комплексов L1-Zn и L1-Ca с донором электрона Trp методами ЯМР (Рисунок 22) и ХПЯ (Рисунок 23).



**Рисунок 22.** Фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров растворов L1 (5 мМ) и Trp (10 мМ) в смеси 50%  $\text{D}_2\text{O}$  и 50%  $\text{CD}_3\text{OD}$  до и после облучения в отсутствии и присутствии  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{ZnCl}_2$  (5 мМ). Температурные условия экспериментов: 25 °С.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

Видно, что в присутствии Trp скорость фотодеградаци L1 увеличивается. Напротив, из сравнения Рисунков 22 и 19 заметно, что скорость фотодеградаци L1 в комплексе с ионами Ca в присутствии Trp упала по сравнению со скоростью фоторазложения в отсутствие Trp. Это может быть связано с поглощением части света молекулами Trp ( $\epsilon_{\text{Trp}}=10^2 \text{ M}^{-1}\times\text{см}^{-1}$ ). Реакция переноса электрона между молекулами Trp и L1 является более обратимой, чем реакция между двумя молекулами L1 в комплексе. Под степенью обратимости понимается отношение скоростей обратного переноса электрона и образования продуктов. Об обратимости этой реакции свидетельствует и наличие поляризации на исходном L1 в реакции с Trp. Как и в предыдущем случае, поляризованный L1 образуется в результате обратного переноса электрона. Видно, что перенос электрона в этой реакции может идти как из триплетного возбужденного состояния L1, так и в результате фотоионизации Trp [147]. В тоже время скорость фоторазложения L1 в комплексе с цинком существенно выше, что коррелирует с более сильным влиянием цинка на спектр поглощения L1 по сравнению с ионами кальция. Предполагается, что этот эффект может быть связан со значительным увеличением поглощения на длине волны 308 нм в присутствии ионов цинка.



**Рисунок 23.** Фрагменты  $^1\text{H}$  ХПЯ спектров растворов L1 (5мМ) и Trp (10 мМ) в смеси 50%  $\text{D}_2\text{O}$  и 50%  $\text{CD}_3\text{OD}$  в отсутствие и присутствии  $\text{ZnCl}_2$  и  $\text{CaCl}_2$  (5 мМ). Температурные условия экспериментов: 25 °С.  $^1\text{H}$  квазистационарные ХПЯ спектры были сняты на приборе Bruker DPX-200.

При анализе спектров ХПЯ (Рисунок 23) можно заметить увеличение поляризации L1 в комплексе L1-Ca, что также можно объяснить увеличением степени поглощения на длине волны излучения лазера. В присутствии ионов Zn наблюдается исчезновение поляризации на L1, что указывает на необратимость реакции, а также появление поляризации на Trp, что согласно литературным данным свидетельствует об образовании нейтрального радикала Trp [148].

#### 4.6. Заключение к главе

В данном исследовании показано, что деферипрон разлагается при облучении светом с длиной волны ниже 310 нм, комплекс L1-Fe(III) разлагается при облучении светом с длиной волны ниже 420 нм. Исследованы фотохимические реакции деферипрона с донорами электрона N-ацетил-L-триптофаном, NADH и акцепторами электрона дихлорбензохиноном и AQDS. Установлено, что деферипрон проявляет как донорные, так и акцепторные свойства в фотохимических реакциях. Описаны механизмы фотохимических реакций с донорами и акцепторами электрона, радикальные интермедиаты и основные продукты фотодеградации. Помимо этого, установлено, что хелатирование деферипрона с ионами металлов ускоряет реакцию фотодеградации деферипрона. Присутствие N-ацетил-L-триптофана замедляет образование фотопродуктов за счет обратимости переноса электрона.



## Глава 5. ВЛИЯНИЕ ДЕФЕРИПРОНА НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ КИСЛОРОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ГОМОГЕННЫХ РАСТВОРАХ

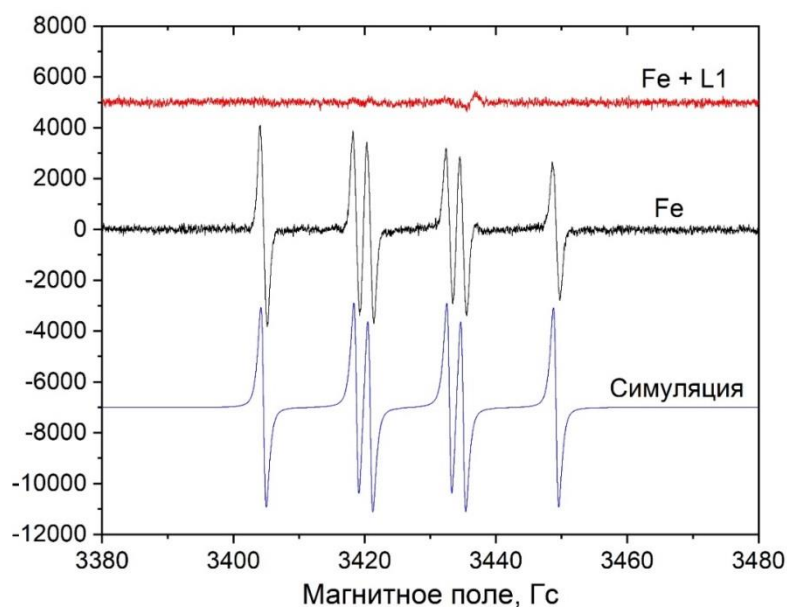
В главе 5 описывается исследование редокс активности хелатных комплексов деферипрона с ионами Fe(III) и Cu(II) в отсутствие и присутствии аскорбиновой кислоты методом ЭПР со спиновыми ловушками в гомогенных растворах.

### 5.1. Влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в фотоиндуцированных реакциях с участием ионов железа

Анализируя материалы по окислительно-восстановительным реакциям с участием хелатных комплексов L1 с ионами металлов переменной валентности, можно сделать вывод, что информация о редокс активности хелатора, а также его хелатных комплексов описана в литературе недостаточно, включая лишь измерение окислительно-восстановительных потенциалов комплексов L1 с ионом Fe(III) [81;108]. Известно, что многие препараты-хелаторы а также их хелатные комплексы с ионами металлов являются редокс активными как в темновых, так и в фотоиндуцированных реакциях и способны индуцировать генерацию АКР [87;149;150]. Кроме того, известно, что ионы железа способны образовывать аквакомплексы, являющиеся редокс активными и разлагающиеся под действием света с образованием  $\text{OH}^\bullet$  [40;41] (Уравнения 30,31, см. страницу 20).

В связи с этим, следующим этапом работы являлось исследование антиоксидантной активности L1 в реакции разложения аквакомплексов железа под действием света методом ЭПР со спиновыми ловушками [151]. В качестве источника света была использована ртутная лампа, схема установки описана в главе 2.3.3.2. Установлено, что спиновая ловушка DMPO фотохимически нестабильна и способна генерировать спиновые аддукты при облучении ртутной лампой. Кроме того, DMPO способна вступать в реакцию с ионами Fe(III) в

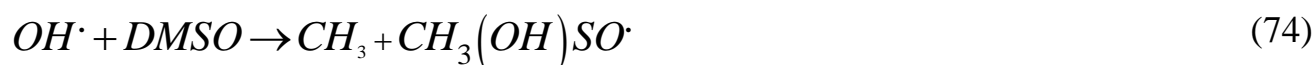
условиях низкой освещенности, что было видно по изменению цвета раствора  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  после добавления спиновой ловушки. Кроме того, К. Макино [152] было показано, что данная ловушка способна образовывать хелатные комплексы  $\text{Fe-DMPO}$ . Поэтому в данных экспериментах были использованы спиновые ловушки PBN (Схема 7, см. страницу 47) и ТМЮ (Схема 6, см. страницу 46). Аквакомплекс с ионом  $\text{Fe}(\text{III})$  имеет интенсивную полосу поглощения до 400 нм [19;40]. При облучении водного раствора  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  в присутствии спиновых ловушек полным светом ртутной лампы и через фильтр Hg366 (полоса пропускания от 360 до 372 нм) наблюдается сигнал от спиновых аддуктов. Данный диапазон облучения был выбран на основании результатов, полученных при исследовании фотолиза хелатного комплекса  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$  (глава 4.1). В качестве примера показан ЭПР спектр спинового аддукта для ловушки ТМЮ (Рисунок 24). Аналогичный результат был получен с использованием PBN [151]. Константы СТВ задетектированных спиновых аддуктов соответствуют константам аддукта с  $\text{OH}^\bullet$  (ТМЮ-ОН,  $a(\text{N})=14.25$  Гс,  $a(\text{H})=16.25$  Гс; PBN-ОН,  $a(\text{N})=16.0$  Гс,  $a(\text{H})=2.7$  Гс) [153;154]. Эти результаты соответствуют ранее опубликованным данным о формировании  $\text{OH}^\bullet$  при фотооблучении аквакомплексов железа [19;40].



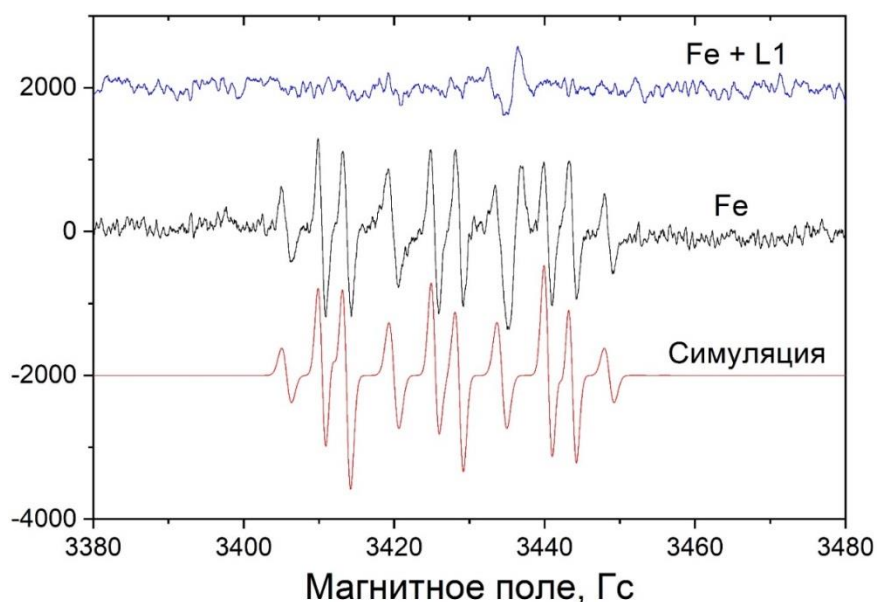
**Рисунок 24.** ЭПР спектры, зарегистрированные при облучении водного раствора ФБ (рН 7.4)  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  (1 мМ) ртутной лампой с водяным фильтром с ловушкой ТМЮ (10 мМ) в отсутствии и присутствии L1 (3 мМ). Синим цветом обозначен модельный спектр ОН аддукта ТМЮ. Расчетный спектр был сделан с помощью программы WINSIM. Температурные условия экспериментов: 25 °С.

Хотя существует много примеров образования PBN-OH аддукта в реакции Фентона или при облучении  $H_2O_2$ , некоторые исследования указывают на то, что тот же аддукт может быть сформирован опосредовано через взаимодействие спиновой ловушки с ионами металлов и молекулами воды [154;155]. Формирование спиновых аддуктов  $OH^\bullet$  с нитронами может быть объяснено либо окислением ловушки ионом железа в возбужденном состоянии с последующим взаимодействием катион-радикала ловушки с водой, либо взаимодействием молекулы воды с ловушкой с образованием соответствующего гидроксилamina, с последующим окислением спиновой ловушки до аддукта с  $OH^\bullet$  [155].

Для того, чтобы доказать образование  $OH^\bullet$  непосредственно в фото-Фентон реакции, был проведен эксперимент с использованием ДМСО (диметилсульфоксид). Известно, что в присутствии ДМСО  $OH^\bullet$  трансформируется в метильный радикал ( $CH_3^\bullet$ ) через реакцию (Уравнение 74) с последующим образованием метоксильного радикала ( $OCH_3^\bullet$ ) при реакции с растворенным кислородом [153;154].



Для доказательства формирования  $CH_3^\bullet$  и  $OCH_3^\bullet$  была проведена серия ЭПР экспериментов со спиновыми ловушками ТМЮ и PBN в смеси вода (90%) - ДМСО (10%) [151]. Показано, что при облучении раствора  $Fe(ClO_4)_3$  светом свыше 366 нм детектируется сигнал с константами СТВ, соответствующими спиновым аддуктам  $CH_3^\bullet$  и  $OCH_3^\bullet$ : ТМЮ- $CH_3^\bullet$ ,  $a(N)=15.61$  Гс,  $a(H)=22.27$  Гс; PBN- $OCH_3^\bullet$ ,  $a(N)=15.10$  Гс,  $a(H)=3.29$  Гс [153;154]. В качестве примера на Рисунке 25 приведены ЭПР спектры облучённых растворов  $Fe(ClO_4)_3$  с ловушкой PBN в отсутствии и присутствии L1.



**Рисунок 25.** ЭПР спектры, зарегистрированные при облучении ртутной лампой через водяной и оптический фильтры (Hg366) 1 мМ раствора ФБ  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  с добавлением 10% ДМСО с ловушкой PBN (10 мМ) в отсутствии и присутствии L1 (3мМ). Красным цветом обозначен модельный спектр  $\text{OH}$ ,  $\text{CH}_3$  и  $\text{OCH}_3$  аддуктов PBN. Расчетный спектр был сделан с помощью программы WINSIM. Температурные условия экспериментов: 25 °С.

Неопознанный сигнал на 3437 Гс на Рисунке 25 является сигналом от кварцевой кюветы, минорный сигнал ( $a(\text{N})=14.33$  Гс,  $a(\text{H})=14.11$  Гс) соответствует *t*-бутил-аминоксилу, полученному в результате разложения PBN [156].

Облучение тех же растворов в присутствии L1 ( $[\text{L1}]:[\text{Fe}(\text{III})]=3:1$ ) показывает полное отсутствие  $\text{OH}^\bullet$  и  $\text{OCH}_3^\bullet$ . Важно отметить, что L1 ингибирует образование  $\text{OH}^\bullet$  в широком диапазоне pH: 3.0-10.8. Помимо этого, при облучении раствора светом на длине волны 546 нм спиновые аддукты не образуются, что согласуется с фотостабильностью хелатного комплекса L1-Fe(III) в данном волновом диапазоне облучения. Следует отметить, что в этих экспериментальных условиях лиганд полностью связывается с Fe(III), образуя хелатный комплекс  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_1_3]$  с константами равновесия:  $\log\beta_1=15.1$ ,  $\log\beta_2=11.51$ ,  $\log\beta_3=9.27$  [157]. Таким образом, абсолютное большинство лигандов закомплексовано и реакция свободного L1 с  $\text{OH}^\bullet$  не может объяснить полученные результаты. Концентрации 1 мМ  $\text{Fe}^{3+}$  и 3 мМ L1 были использованы в исследованиях для получения сигнала ЭПР большей интенсивности. Ингибирование в более низких концентрациях L1 *in vitro* и *in vivo* было показано

в других публикациях [158;159]. Исходя из этого можно сделать вывод, что причиной ингибирования образования свободных радикалов является образование хелатных комплексов L1-Fe(III) в растворе.

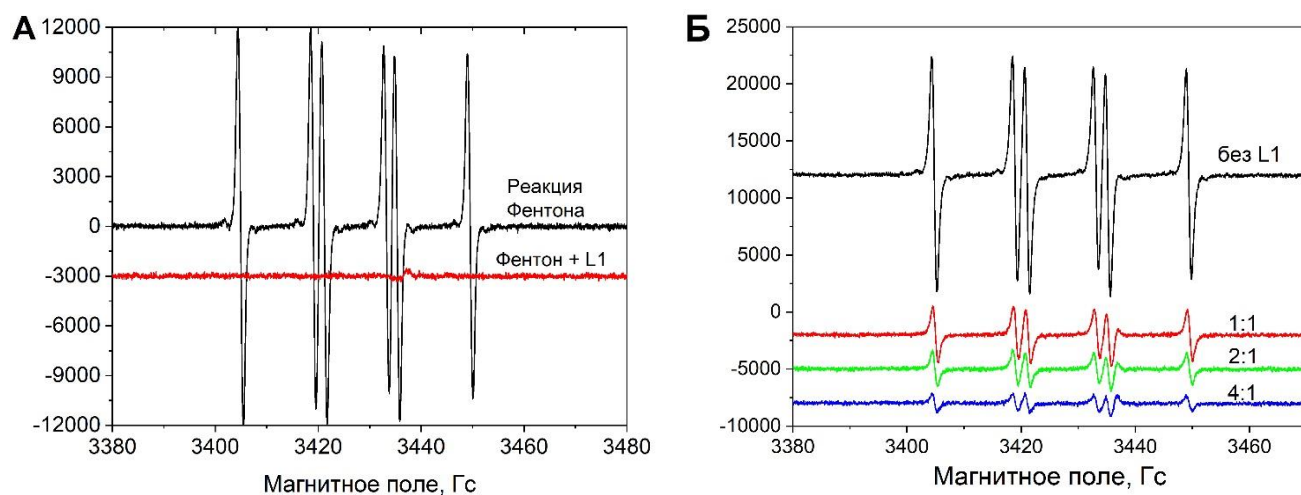
Облучение L1 в присутствии ТМЮ при отсутствии солей металлов в растворе не показывает формирования спиновых аддуктов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что L1 не образует АКР под воздействием света через перенос электрона или перенос протона. Кроме того, можно предположить, что радикалы L1, зарегистрированные методом ХПЯ (Глава 4), не захватываются спиновыми ловушками. Отсутствие сигнала от других спиновых аддуктов в реакции приводит к выводу, что перенос электрона от анион-радикала L1 к растворенному кислороду не происходит.

Помимо  $\text{OH}^\bullet$  фототоксичность лекарственных средств может проявляться в генерации  $^1\text{O}_2$ , обычно образующегося путем переноса энергии из триплетного состояния лиганда к молекуле кислорода [128;160].  $^1\text{O}_2$ , также как и  $\text{OH}^\bullet$ , способен окислять белки и липиды, а также вызывать повреждение ДНК [19]. В попытке обнаружить  $^1\text{O}_2$  при фотолизе L1 был использован стандартный подход – использование ловушки ТЕМР (Схема 9, см. страницу 48) [128]. Тем не менее, после 20 мин облучения растворов чистого L1 или комплекса L1-Fe ни одного спинового аддукта не обнаружено, что указывает на отсутствие переноса энергии от триплета L1 к молекуле кислорода [151].

## **5.2. Влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в реакции Фентона с участием ионов железа**

Помимо исследования влияния L1 на генерацию свободных радикалов в фотоиндуцированных реакциях, также исследовалось его влияние и в темновых реакциях, таких как реакция Фентона с участием ионов железа (Уравнения 4,6,8, см. страницу 18) [151]. В ходе данной реакции образуются АКР, которые, как уже отмечалось выше, способны негативно влиять на клетки и ткани организма.

На Рисунке 26 показаны спиновые аддукты, полученные в результате реакции Фентона с участием железа в отсутствии и присутствии L1.



**Рисунок 26.** А: ЭПР спектр аддукта ТМЮ–ОН, зарегистрированный в реакции Фентона в ФБ (рН 7.4, 1 мМ FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 мМ, ТМЮ 10 мМ) в присутствии и отсутствии L1 (10 мМ). Б: ЭПР спектры спинового аддукта ТМЮ–ОН в отсутствии и присутствии L1; Реакционная смесь: 20 мМ ТМЮ; 3 мМ FeCl<sub>3</sub>; 12 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3 мМ L1(красный); 6 мМ L1(зеленый); 12 мМ L1(синий). Эксперименты были проведены при комнатной температуре (25 °С).

Константы СТВ спинового аддукта на Рисунке 26А идентичны константам ТМЮ–ОН аддукта на Рисунке 24 (ТМЮ–ОН,  $a(N)=14.25$  Гс,  $a(H)=16.25$  Гс). Добавление избытка L1 к раствору соли железа полностью ингибирует образование OH<sup>•</sup>. При проведении реакции в 10% растворе ДМСО общий выход продуктов уменьшается, что может быть обусловлено более низкой скоростью захвата CH<sub>3</sub><sup>•</sup> и ОСН<sub>3</sub><sup>•</sup>. Также было замечено значительное снижение выхода спинового аддукта в присутствии L1. Этот результат подтверждает предположения, сделанные ранее о том, что L1 окисляет Fe(II) в Fe(III), не подтверждая механизм, предложенный Меркофером и др [161]. Предложенный им механизм предполагает, что комплекс L1-Fe(III) образуется в присутствии L1 в результате реакции Fe(II) с перекисью водорода [162]. Результаты, полученные в настоящей работе, указывают на то, что комплекс [Fe<sup>III</sup>L<sub>3</sub>] является редокс неактивным, как ранее и предполагалось Девануром и др. [163].

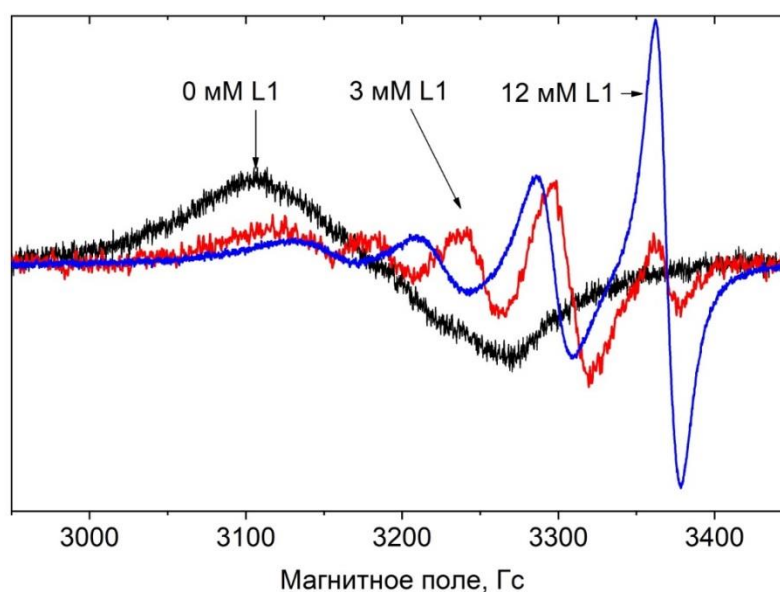
Кроме того, полученные ЭПР результаты по генерации OH<sup>•</sup> в реакции Фентона при различных соотношениях концентраций L1:Fe в низком рН (3,3) (Рисунок 26Б) показывают, стехиометрия комплекса [Fe<sup>III</sup>L<sub>2</sub>], преобладающая в

данных условиях [105;164], негативно влияет на антиоксидантные свойства L1 по ингибированию реакции закомплексованного иона железа с перекисью водорода. Действительно, в данном случае перекись водорода может более свободно координироваться с Fe(III) с последующим переносом электрона с образованием  $\text{OH}^\bullet$ .

В связи с этим, нами было показано, что L1 способен ингибировать образования  $\text{OH}^\bullet$  и подтверждены более ранние исследования, что L1 обладает антиоксидантными свойствами [165;166].

### 5.3. Влияние деферипрона на генерацию активных кислородных радикалов в реакции Фентона с участием ионов меди

Как уже было показано в главе 3.2 L1 способен образовывать устойчивые хелатные комплексы с ионами меди. В качестве дополнительного доказательства были проведены ЭПР эксперименты смеси растворов соли  $\text{Cu(II)}$  и L1 (Рисунок 27) [136]. В водном растворе спектр ЭПР показывает четыре хорошо разрешенные сверхтонкие линии, ожидаемые для  $\text{Cu(II)}$ , характеризующегося ядерным спином  $3/2$ .

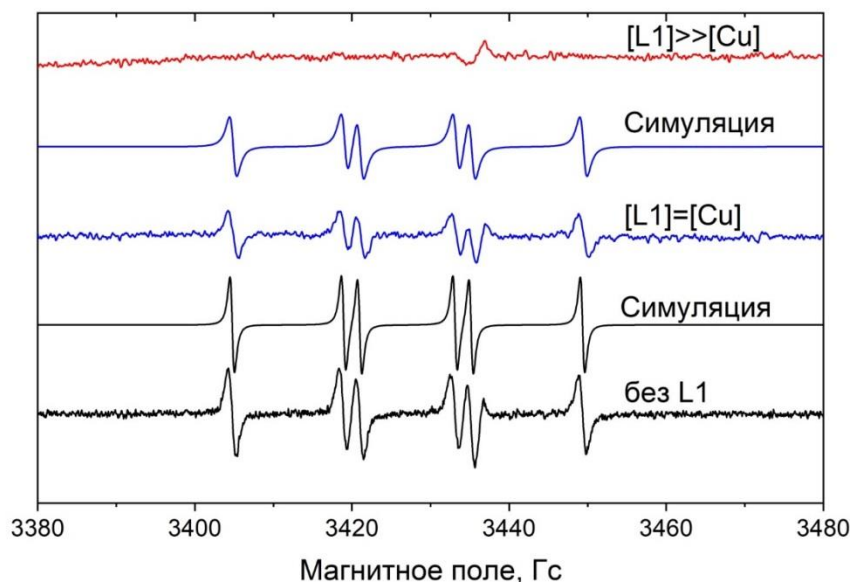


**Рисунок 27.** ЭПР спектры 3мМ  $\text{Cu(As)}_2$  в водных растворах (рН 6) в отсутствии (черный спектр) и присутствии L1 при концентрациях 3 мМ (красный спектр) и 12 мМ (синий спектр). Температурные условия экспериментов: 25 °С.

Спектр ЭПР ионов  $\text{Cu(II)}$ , обнаруженный в присутствии L1 при комнатной температуре, подобен другим комплексам меди, описанным различными авторами [167;168].

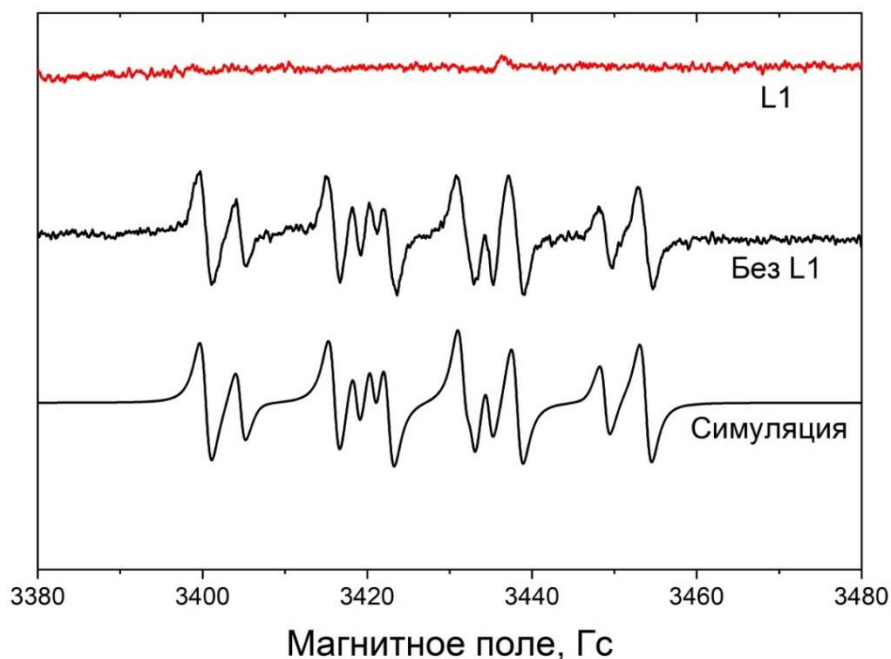
Для исследования редокс активности хелатного комплекса L1-Cu был проведен ряд ЭПР исследований [136]. Известно, что ионы меди способны вступать в редокс реакции с перекисью водорода (реакция Фентона) с образованием  $\text{OH}^\bullet$  и  $\text{OON}^\bullet$  (Уравнения 24,26,28,29, см. страницу 19) [134;169;170]. На Рисунке 28 представлены спектры ЭПР спиновых аддуктов, обнаруженных при взаимодействии  $\text{CuAc}_2$  с  $\text{H}_2\text{O}_2$  в водном растворе с различными концентрациями L1 ( $\text{L1}:\text{Cu} = 1:1$  и  $\text{L1}:\text{Cu} = 4:1$ ). На основании полученных данных было выявлено, что константы СТВ спинового аддукта, обнаруженные в наших экспериментах в отсутствие L1 ( $a(\text{N})=14,20$  Гс,  $a(\text{H})=16,17$  Гс), близки к литературным данным для спинового аддукта ТМЮ-ОН:  $a(\text{N})=14,2\pm 0,1$  Гс,  $a(\text{H})=16,3$  Гс [171;172]. При условии  $[\text{Cu}]=[\text{L1}]$  аддукт ТМЮ-ОН все еще обнаруживается. Только при концентрации L1 выше  $2[\text{Cu}^{2+}]$  в растворе сигнал аддукта ТМЮ-ОН исчезает. Подобные эффекты были обнаружены при исследовании антиоксидантной активности комплекса Fe(III)-L1 (глава 5.2). Таким образом, было показано, что при стехиометрии комплекса  $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}_1\text{L}_2]$  закомплексованный ион наименее эффективно вступает в реакцию Фентона.





**Рисунок 28.** Экспериментальные и модельные спектры ЭПР, зарегистрированные при взаимодействии 3 мМ водного раствора  $\text{Cu}(\text{Ac})_2$  с 3 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 20 мМ ТМЮ в отсутствии (черный) и в присутствии L1 при концентрациях 3 мМ (синий), 12 мМ (красный) при pH 6,0. Синим цветом обозначен модельный спектр с константами СТВ  $a(\text{N})=14,20$  Гс,  $a(\text{H})=16,17$  Гс и шириной линии 0,57 Гс. Расчетный спектр был сделан с помощью программы WINSIM. Температурные условия экспериментов: 25 °С.

Для проверки системы на окисление ловушки ионами меди был проведен дополнительный ЭПР (Рисунок 29) эксперимент с добавлением ДМСО, подробно описанный в главе 5.1 (Уравнение 74, см. страницу 83) [136]. Образование  $\text{CH}_3^\bullet$  и  $\text{OCH}_3^\bullet$  в исследуемых системах доказано обнаружением соответствующих спиновых аддуктов с константами СТВ:  $a(\text{N})=15,61$  Гс,  $a(\text{H})=22,18$  Гс. Эти константы СТВ аналогичны опубликованным данные для ТМЮ- $\text{CH}_3$  ( $a(\text{N})=15,6$  Гс,  $a(\text{H})=22,3\pm 0,1$  Гс) [127;128]. Относительное количество этого аддукта составляет 75% в аэрированном растворе и увеличивается в растворе, насыщенном аргоном. Второй сигнал,  $a(\text{N})=14,07$  Гс,  $a(\text{H})=16,08$  Гс, может принадлежать аддуктам ТМЮ-ОН или ТМЮ- $\text{OCH}_3$ , которые по литературным данным имеют очень близкие значения СТВ [127;128;173].

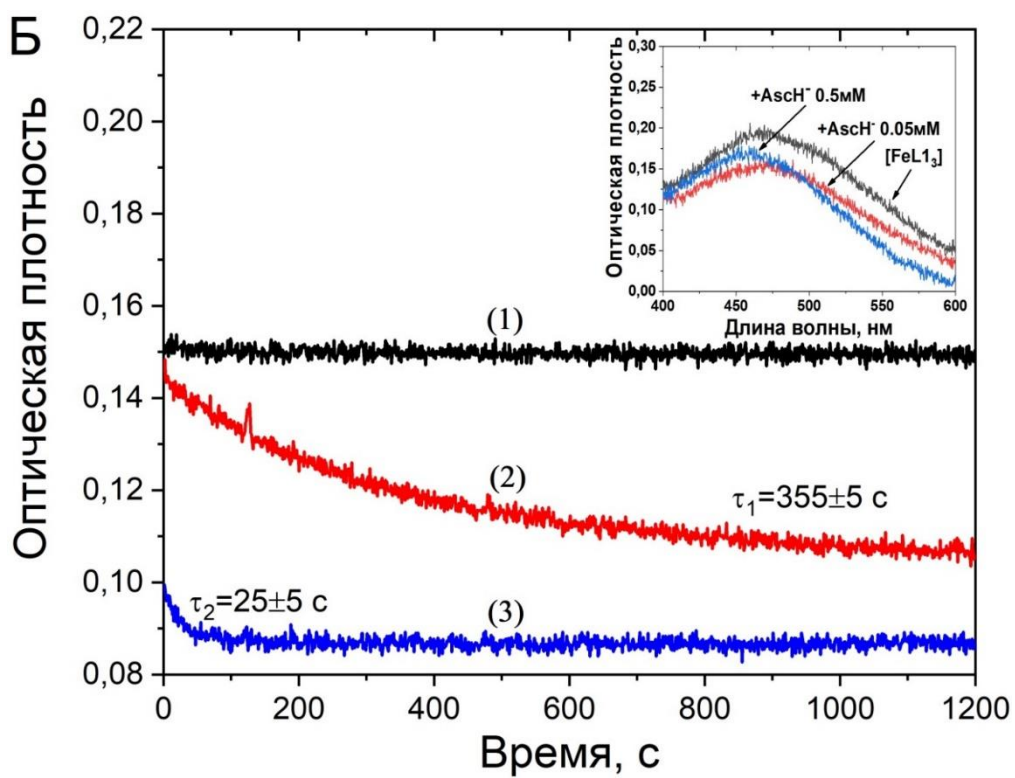
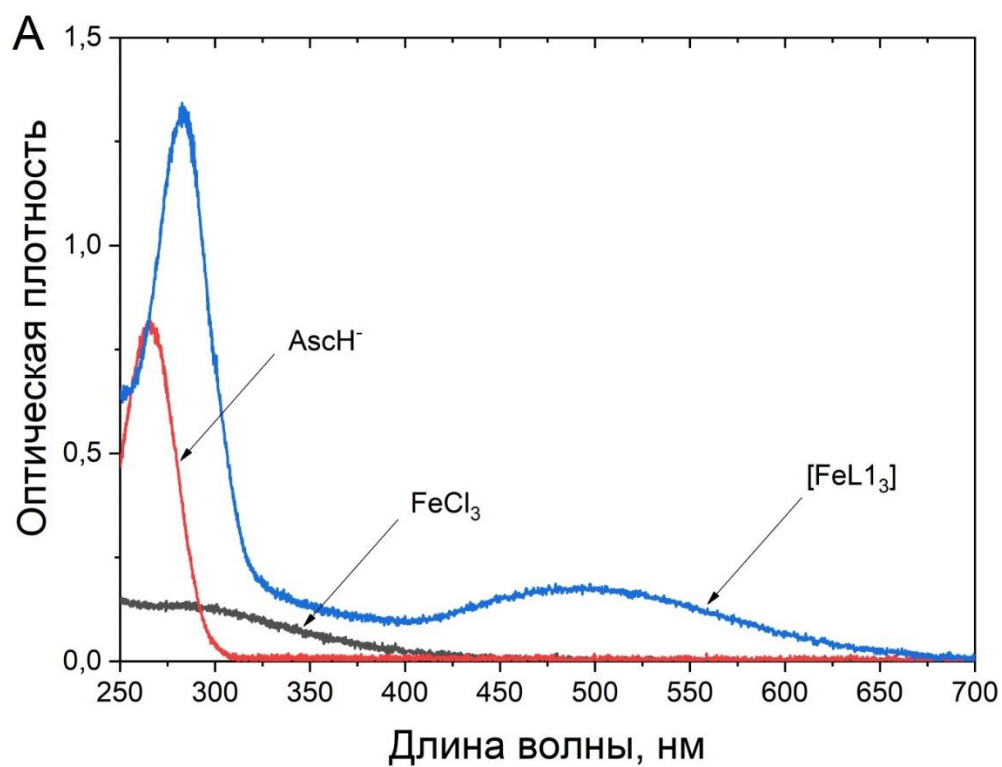


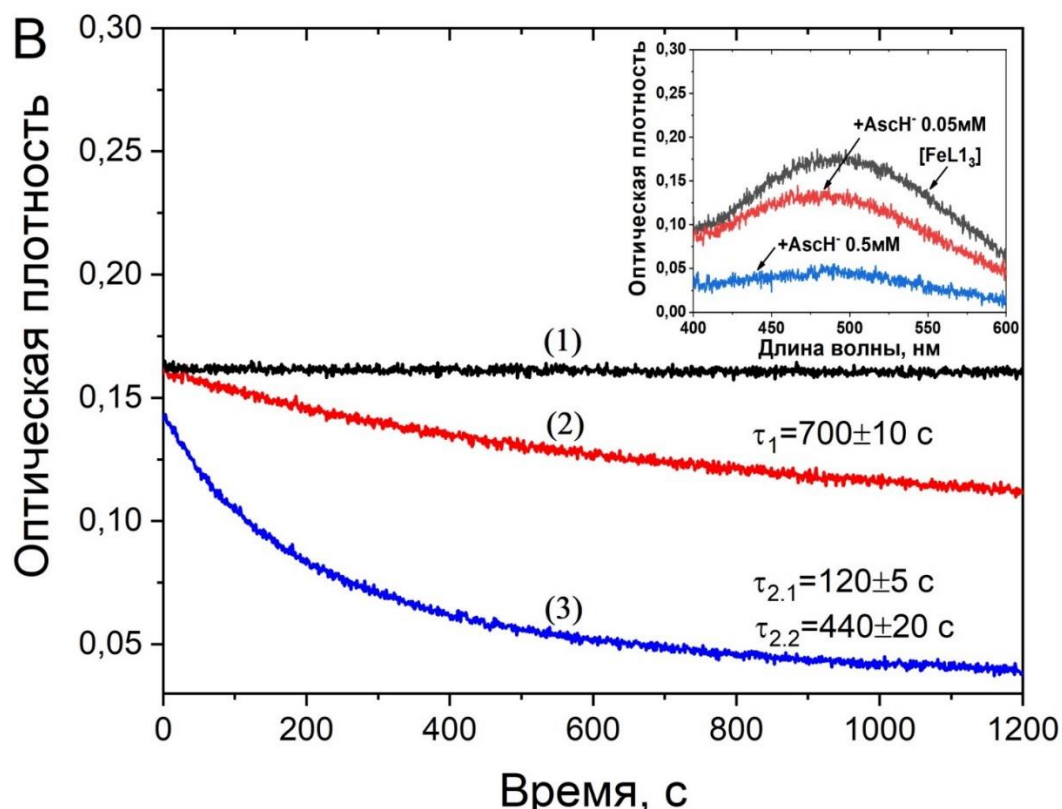
**Рисунок 29.** Экспериментальные и модельные спектры ЭПР, зарегистрированные при взаимодействии 3 мМ  $\text{Cu}(\text{Ac})_2$  с 3 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 10% аэрированном растворе ДМСО с 20 мМ ТМЮ в отсутствии (черный) и в присутствии (красный) 6 мМ L1. Параметры моделирования: первый аддукт (75 %):  $a(\text{N})=14,20$  Гс,  $a(\text{H})=16,17$  Гс, второй аддукт (25 %):  $a(\text{N})=14,07$  Гс,  $a(\text{H})=16,08$  Гс, линия ширина = 1,13 Гс. Расчетный спектр был сделан с помощью программы WINSIM. Температурные условия экспериментов: 25 °С.

Не идентифицированный одиночный сигнал при 3437 Гс на Рисунке 29 является сигналом от кварцевой кюветы. Данные ЭПР, представленные в данной работе, указывают на то, что комплекс  $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}_2]$  является редокс неактивным, как это предполагалось ранее для комплекса  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$  [163]. Следует отметить, что в условиях наших экспериментов абсолютное большинство ионов  $\text{Cu}(\text{II})$  закомплексовано, судя по высоким константам равновесия комплексов (Таблица б). Таким образом, оказывается, что в растворе нет достаточной концентрации свободных лигандов, и наши экспериментальные наблюдения не могут быть объяснены реакцией свободного L1 с  $\text{OH}^\cdot$ .

#### 5.4. Влияние аскорбиновой кислоты на антиоксидантную активность деферипрона в реакции Фентона с участием ионов железа

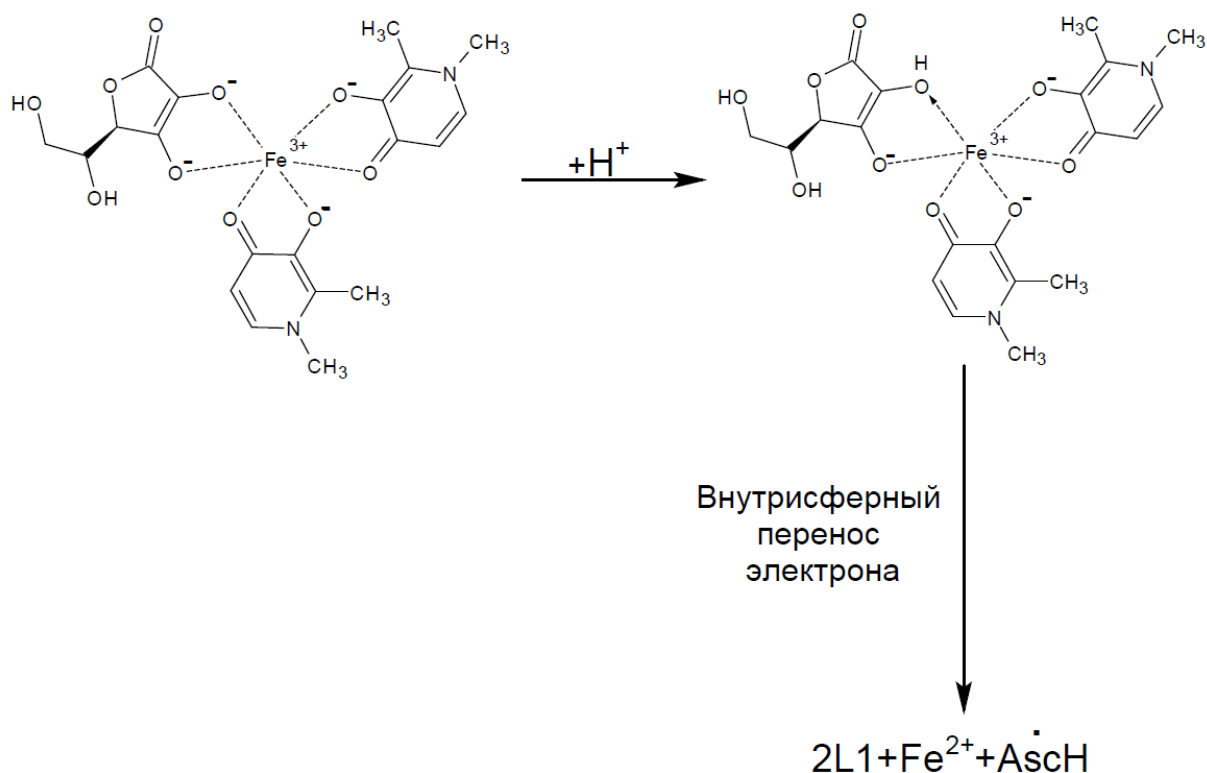
Как было сказано ранее,  $\text{AscH}_2$  способна проявлять как антиоксидантную, так и про-оксидантную активность, в частности в реакции с ионами железа (Уравнение 43, см. страницу 25) [174]. Для изучения влияния  $\text{AscH}_2$  на антиоксидантную активность хелатного комплекса  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$  была проведена серия оптических экспериментов с целью понять непосредственное взаимодействие хелатного комплекса с молекулами  $\text{AscH}_2$  [175]. После добавления  $\text{AscH}_2$  наблюдался гипсохромный сдвиг полосы поглощения хелатного комплекса в красной области спектра (Рисунки 30Б, В). Было предположено, что это изменение связано с изменением структуры хелатного комплекса: заменой одного лиганда L1 на  $\text{AscH}$  с образованием смешанного комплекса  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_2\text{Asc}]$ . Чтобы получить характерное время этой реорганизации, был рассчитан временной профиль изменения оптической плотности раствора при 525 нм после добавления  $\text{AscH}_2$ . Скорость этого процесса при нейтральном pH 7,4 зависит от концентрации  $\text{AscH}_2$  с характерными временами 350 с при  $[\text{AscH}_2] = 0,05$  мМ и 25 с при  $[\text{AscH}_2] = 0,5$  мМ (Рисунок 30Б). Однако в слабокислом растворе при pH 4 образованный комплекс становится нестабильным и полностью распадается в течении нескольких минут (Рисунок 30В).





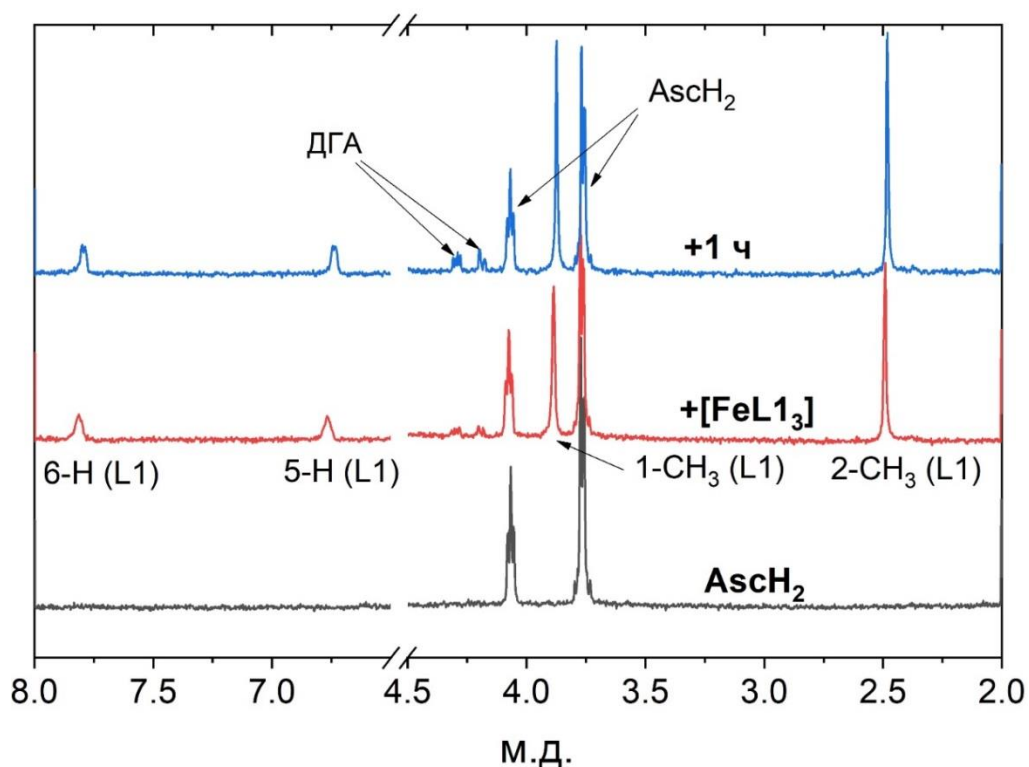
**Рисунок 30. А:** Оптические спектры поглощения  $\text{AscH}_2$  (0.05 мМ),  $\text{FeCl}_3$  (0.05 мМ), и хелатного комплекса  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$  (0.05 мМ) в воде при pH 4.8; **Б:** Кинетики изменения оптической плотности раствора хелатного комплекса  $[\text{FeL}_3]$  на длине волны 525 нм при pH = 7.4: **(1)** соответствует хелатному комплексу в отсутствии  $\text{AscH}_2$  **(2)** - в присутствии 0.05 мМ  $\text{AscH}_2$  и **(3)** 0.5 мМ  $\text{AscH}_2$ ; **В:** аналогичные кинетики при pH 4.0 ( $\text{AscH}_2$  0.5 мМ) и pH 4.8 ( $\text{AscH}_2$  0.05 мМ). Температурные условия экспериментов: 25 °С.

Можно предположить, что происходит восстановление железа в смешанном хелатном комплексе при протонировании  $\text{Asc}^{2-}$  до  $\text{AscH}^-$  (Схема 15), аналогично тому, которое было описано Кейпуrom для комплекса  $\text{Fe(III)-Asc}$  [71].



**Схема 15.** Реакция восстановления железа в смешанном хелатном комплексе  $[Fe^{III}L_2Asc]$ .

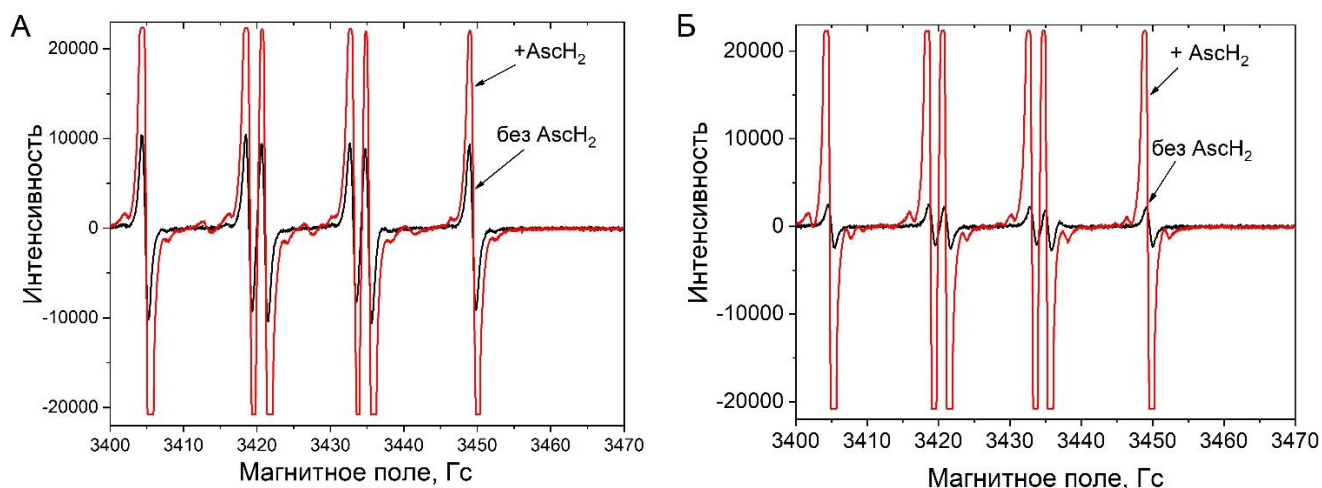
Чтобы выяснить, приводит ли распад смешанного хелатного комплекса в кислых средах к окислению  $AscH_2$ , был применен метод ЯМР [175]. Образование ДГА в реакции  $AscH_2$  с хелатным комплексом  $[Fe^{III}L_3]$  в слабокислом растворе было подтверждено с помощью  $^1H$  ЯМР-спектроскопии. После добавления  $AscH_2$  в раствор хелатного комплекса наблюдается появление сигналов ДГА и их рост с течением времени (Рисунок 31). Можно предположить, что разложение  $AscH_2$  происходит за счет обратимости реакции комплексообразования  $[Fe^{III}L_3]$  [162] и его окисления растворенным кислородом [81]. Также увеличение протонных пиков L1 (Рисунок 31) является дополнительным подтверждением разложения хелатных комплексов  $[Fe^{III}L_2Asc]$ , поскольку парамагнитное уширение линий протонов L1 уменьшается, а их интенсивность возрастает.



**Рисунок 31.** Фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров  $\text{AscH}_2$  (0.4 мМ) в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 4.1 в отсутствие и присутствии хелатного комплекса 0.1 мМ  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_1\text{L}_3]$  сразу после смешивания и через 1 час. Температурные условия экспериментов:  $25^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker AVHD-500.

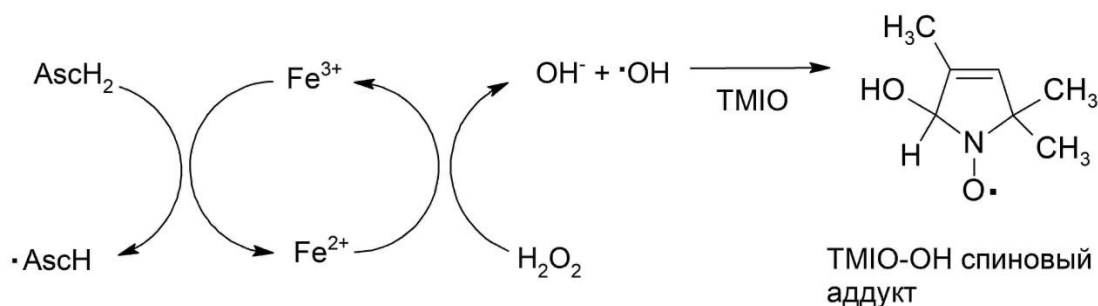
Помимо этого, важной задачей является исследование генерации АКР в данной системе в реакции Фентона в зависимости от соотношения концентраций компонентов, а также изучение антиоксидантной/про-оксидантной активности смешанного хелатного комплекса  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_1\text{L}_2\text{Asc}]$ . Для этого был использован метод ЭПР с использованием спиновой ловушки ТМЮ [175].

Образование  $\text{OH}^\bullet$  в исследуемых системах было доказано обнаружением соответствующего спинового аддукта ТМЮ-ОН (Рисунок 32) [127;173].  $\text{AscH}_2$  в растворе в отсутствие  $\text{L}_1$  (Рисунок 32А) или при одинаковых концентрациях хелатора с ионами железа (Рисунок 32Б) влияет на выход ТМЮ-ОН аддуктов, усиливая их выход.



**Рисунок 32.** ЭПР спектры спинового аддукта ТМЮ-ОН в отсутствии (черный) и присутствии (красный)  $\text{AscH}_2$ , **А:** без L1, **Б:** 3 мМ L1; Реакционная смесь: 20 мМ ТМЮ; 3 мМ  $\text{FeCl}_3$ ; 12 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 10 мМ  $\text{AscH}_2$ ; Температурные условия экспериментов: 25 °С. Раствор:  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 3.3.

Таким образом, можно утверждать, что  $\text{AscH}_2$  образует дополнительный канал реакции образования  $\text{OH}^\bullet$ , участвуя в системе циклических реакций, изображенных на Схеме 16.

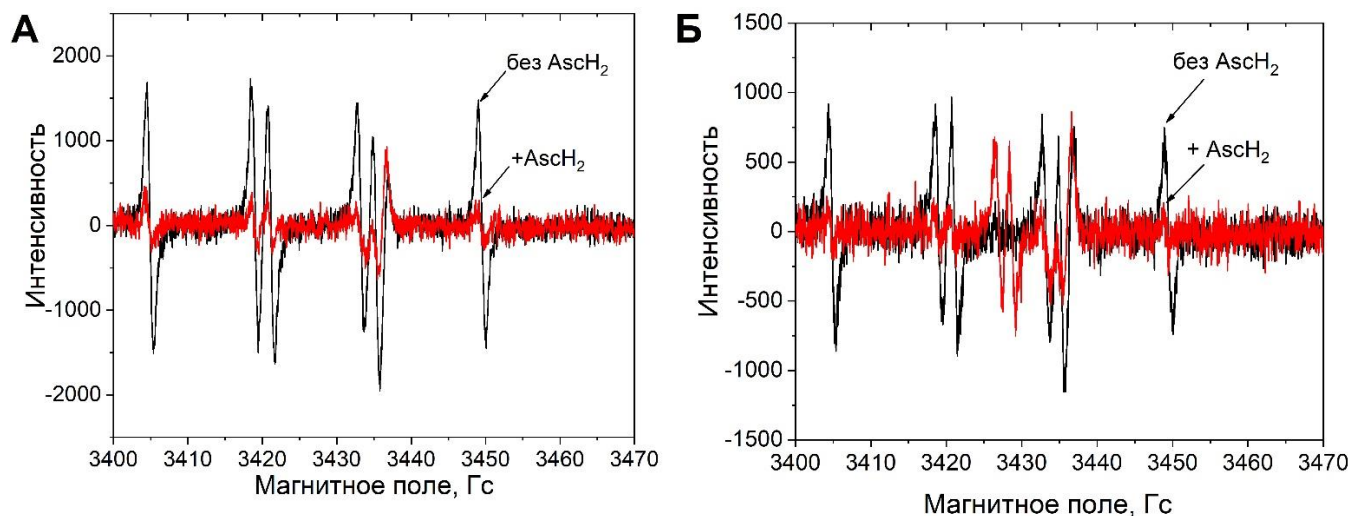


**Схема 16.** Участие  $\text{AscH}_2$  в образовании  $\text{OH}^\bullet$  в реакции Фентона с ионами железа.

Однако ситуация меняется с увеличением концентрации  $\text{AscH}_2$  от 10 до 100 мМ в реакционной смеси. При соотношении концентраций  $[\text{L1}]:[\text{Fe(III)}]=2:1$  или  $4:1$  (Рисунок 33) наблюдаемое количество спинового аддукта ТМЮ-ОН меньше в присутствии  $\text{AscH}_2$  в растворе, чем в её отсутствии. Несмотря на анализ результатов оптических экспериментов (Рисунок 30В) существуют другие факторы, влияющие на уменьшение выхода гидроксильных аддуктов, такие как тушение  $\text{OH}^\bullet$   $\text{AscH}_2$  и превращение спинового аддукта в соответствующий гидросиламин в кислых средах. Из-за своей диамагнитной природы гидросиламин не проявляется в ЭПР спектрах. Этот процесс становится важным,



когда скорость образования  $\text{OH}^\bullet$  уменьшается из-за образования хелатных комплексов  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_2\text{Asc}]$  или  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$ .



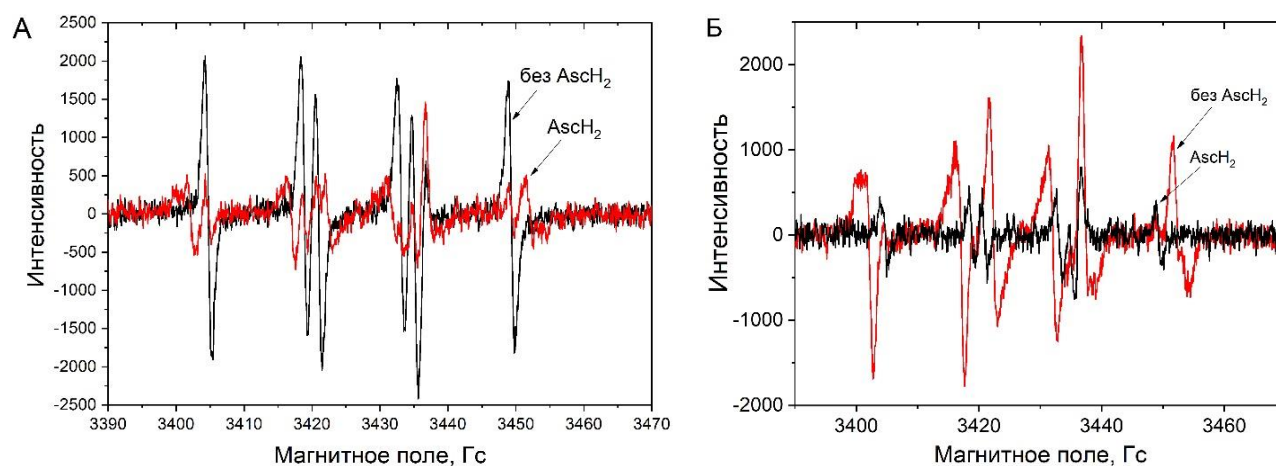
**Рисунок 33.** ЭПР спектры спинового аддукта ТМО-ОН в отсутствии (черный) и присутствии (красный) 100 мМ  $\text{AscH}_2$  при концентрации L1 **А:** 6 мМ; **Б:** 12 мМ; Реакционная смесь: 20 мМ ТМО; 3 мМ  $\text{FeCl}_3$ ; 12 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Температурные условия экспериментов: 25 °С. Раствор:  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 3.0.

При увеличении соотношения  $[\text{L1}]:[\text{Fe(III)}]$  с 2:1 до 4:1 наблюдается дальнейшее снижение интенсивности сигнала от спин-аддукта ТМО-ОН, что соответствует результатам, описанным выше. Кроме того, в этих условиях был обнаружен сигнал от радикала  $\text{AscH}$  с константой СТВ  $a(\text{H})=1,8$  Гс (Рисунок 33Б) [176].

Таким образом, стоит утверждать, что образующийся смешанный хелатный комплекс  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_2\text{Asc}]$  является гораздо менее редокс активным, чем комплексы  $\text{Asc-Fe}$  и даже  $\text{L1-Fe(III)}$  в слабокислых средах с pH 3-5. Данный факт объясняется сдвигом равновесия в сторону стехиометрии комплекса  $[\text{FeL}_2]^+$  в слабокислых средах [10], вследствие чего закомплексованное железо становится более редокс активным. Стоит отметить, что смешанные хелатные комплексы с участием  $\text{AscH}_2$  были описаны в литературе [8;9;70], однако подобные комплексы более редокс активны, чем  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_2\text{Asc}]$ .

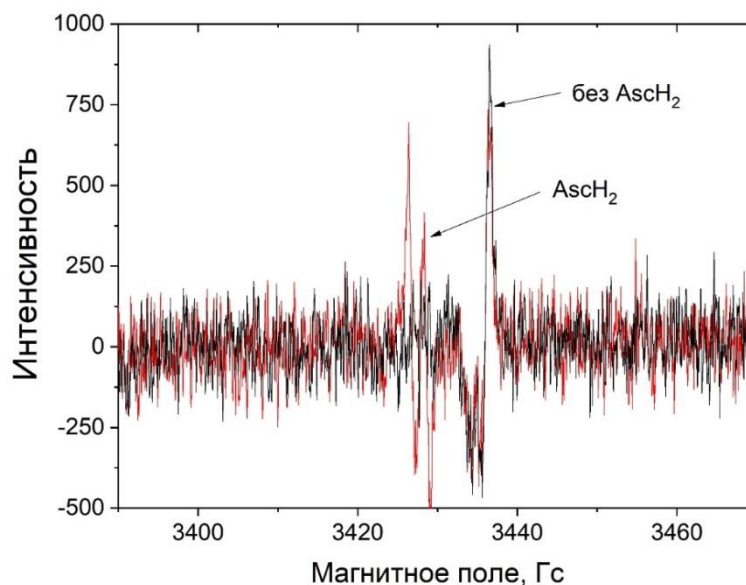
### 5.5. Влияние аскорбиновой кислоты на антиоксидантную активность деферипрона в реакции Фентона с участием ионов меди

Как и в случае с ионами железа, были проведены ЭПР эксперименты со спиновой ловушкой ТМЮ по изучению редокс активности  $\text{AscH}_2$  в реакции Фентона с ионами меди в присутствии L1 (Рисунки 32,33). Видно, что результаты значительно отличаются от данных, полученных с участием ионов железа (Рисунки 34,35). При добавлении  $\text{AscH}_2$  в систему сигнал от спинового аддукта ТМЮ-ОН [127;173] уменьшается, что можно объяснить как антиоксидантной активностью  $\text{AscH}_2$  [64], которая восстанавливает  $\text{OH}^\bullet$ . Кроме того, антиоксидантная активность  $\text{AscH}_2$  влияет на изменение скоростей реакций окисления и восстановления ионов меди в реакции Фентона (Уравнения 24,26,28,29, см. страницу 19): в данной системе лимитирующей стадией является реакция окисления  $\text{Cu}^+$  до  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Cu}^{3+}$ ) (Уравнения 24,29, см. страницу 19). К тому же реакция ионов меди с  $\text{AscH}_2$  (Уравнение 44, см. страницу 25) еще больше смещает равновесие в сторону  $\text{Cu}^+$ . В результате выход ТМЮ-ОН аддуктов ниже, чем в случае с ионами железа.



**Рисунок 34.** ЭПР спектры спинового аддукта водных растворов ТМЮ (20 мМ),  $\text{Cu}(\text{Ac})_2$  (3 мМ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12 мМ) в отсутствии (черный) и присутствии (красный) 10 мМ  $\text{AscH}_2$ ; **А:** в отсутствии L1; **Б:** при концентрации L1 3 мМ. Температурные условия экспериментов: 25 °С. Раствор:  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 3.0.

Тем не менее, при достижении соотношении концентраций  $\text{L1}:\text{Cu}^{2+}=4:1$  в присутствии  $\text{AscH}_2$  регистрируется сигнал от  $\text{AscH}^\bullet$  ( $a(\text{H})=1,8$  Гс, Рисунок 35) [176].



**Рисунок 35.** ЭПР спектры водных растворов ТМЮ (20 мМ),  $\text{Cu}(\text{Ac})_2$  (3 мМ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12 мМ), L1 (12 мМ) в отсутствии (черный) и присутствии (красный) 10 мМ  $\text{AsCH}_2$ . Температурные условия экспериментов: 25 °С. Раствор:  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 3.0.

Помимо этого, в ходе реакции образуется новый спиновый аддукт ( $a(\text{N})=14.89$  Гс,  $a(\text{H})=20.27$  Гс, Рисунок 34), не детектируемый в случае реакции с ионами железа. Для идентификации нового спинового аддукта была подробно изучена литература по разложению  $\text{AsCH}_2$ . Известно, что ДГА является нестабильным продуктом окисления  $\text{AsCH}_2$  и способен гидратироваться с образованием дикетогулоновой кислоты [177]. В дальнейшем дикетогулоновая кислота также разлагается. Механизмы разложения данного соединения различны и зависят от условий эксперимента. Тем не менее, показано, что одним из механизмов разложения является декарбоксилизация дикетогулоновой кислоты [177;178] (Схема 17). Исходя из литературных данных по константам СТВ спиновых аддуктов ловушки ТМЮ, наиболее подходит аддукт анион-радикала  $\text{CO}_2$  ( $a(\text{N})=15.1$  Гс,  $a(\text{H})=20.7$  Гс) [128]. Стоит отметить, что константы СТВ в литературе получены при pH раствора 7.5, поэтому  $\text{CO}_2$ -ТМЮ аддукт способен протонироваться, что может повлиять на константы СТВ аддукта (Схема 18).

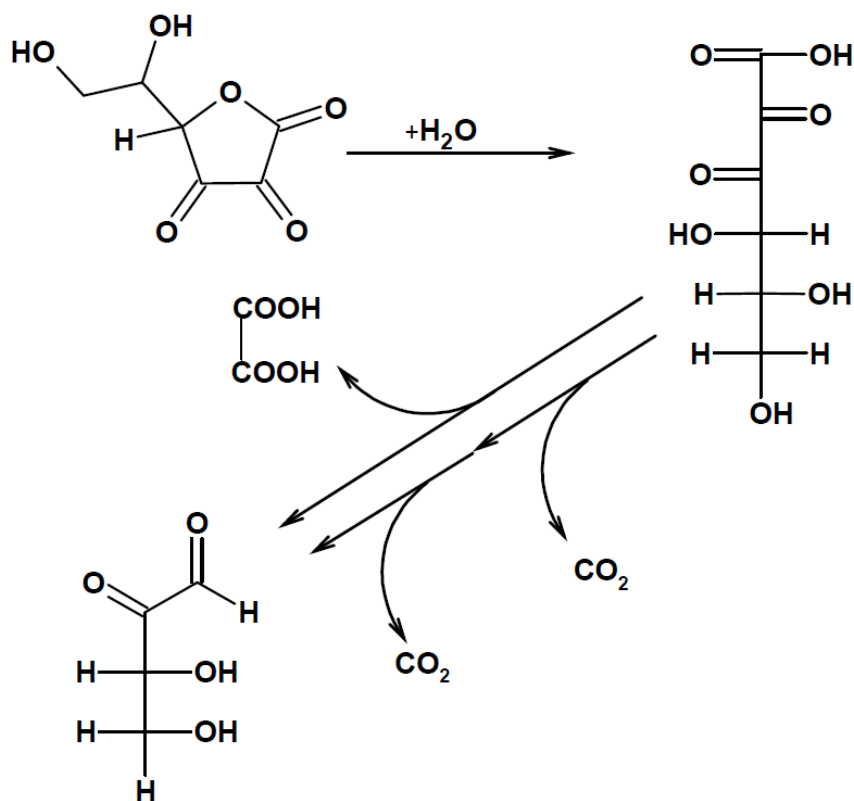


Схема 17. Реакция разложения дикетогулоновой кислоты [178]

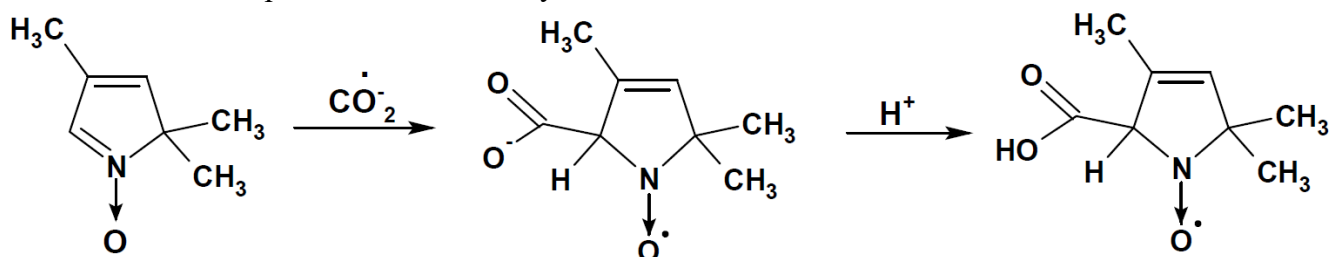


Схема 18. Образование спинового анион аддукта  $CO_2$ -ТМЮ и его протонирования в кислых средах.

Таким образом, в случае системы с участием L1, ионов меди,  $H_2O_2$  и  $AscH_2$  показано, что  $AscH_2$  действует как антиоксидант и уменьшает выход  $OH^\bullet$ . Кроме того, исходя из полученных ЭПР спектров и литературы, было сделано предположение, что образование хелатных комплексов  $[L1-Cu]$  влияет не только на выход  $OH^\bullet$ , но и на путь разложения дикетогулоновой кислоты, в результате чего одним из основных продуктов реакции становятся анион-радикалы  $CO_2^\bullet$ , улавливаемые ловушкой и протонирующиеся в кислых средах.

## 5.6. Заключение к главе

В данном исследовании показано, что деферипрон проявляет антиоксидантную активность и ингибирует генерацию гидроксильных радикалов в реакции Фентона с участием ионов железа и меди. Эффективность антиоксидантной активности зависит от соотношения концентраций лиганд:металл а также рН раствора, что влияет на координацию ионов металла и возможность встраивания перекиси водорода во внутреннюю сферу комплекса с дальнейшей окислительно-восстановительной реакцией, что говорит об стерической природе антиоксидантного механизма хелатора. Кроме того, было показано, что аскорбиновая кислота проявляет как антиоксидантную, так и про-оксидантную активность в реакции Фентона с участием ионов железа и меди. На основании полученных данных был предложен механизм редокс активности аскорбиновой кислоты в системе деферипрон-железо, основанный на возможности образования хелатных комплексов  $[FeL_1_2Asc]$ , стабильных в нейтральных растворах (рН 7) и разлагающихся в кислых (рН<4). Помимо этого, установлено, что механизм разложения вторичных продуктов окисления аскорбиновой кислоты в присутствии ионов меди имеет радикальную природу.

## **Глава 6. АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕФЕРИПРОНА В ОРГАНИЗОВАННЫХ СИСТЕМАХ**

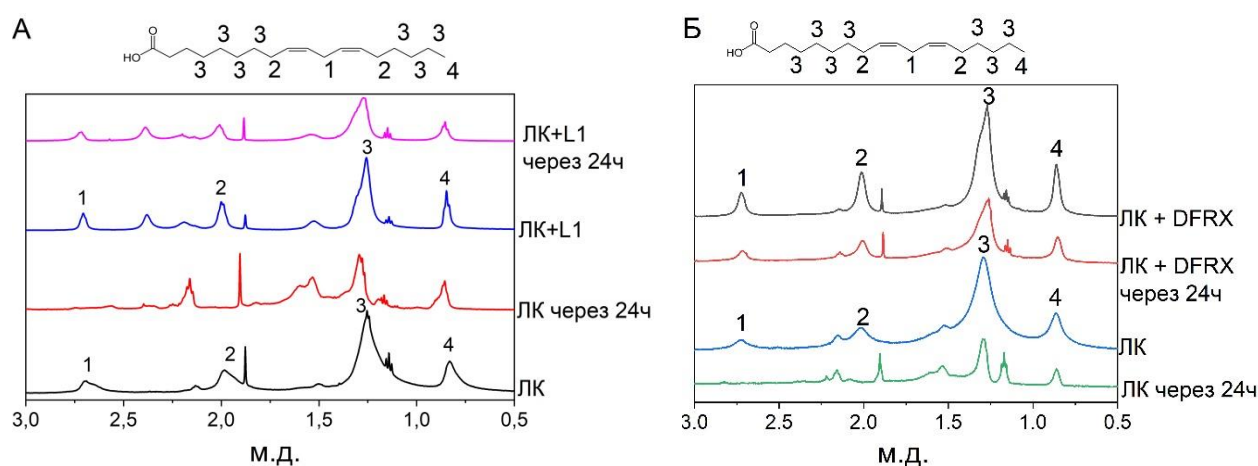
Данная глава посвящена исследованию антиоксидантной активности деферипрона в реакции перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди методом ядерного магнитного резонанса, а также сравнение эффективности ингибирования окисления липидных мембран с хелатором деферазироксом.

### **6.1. Антиоксидантная активность деферипрона в реакции перекисного окисления липидов. Сравнение с деферазироксом**

Другим, не менее важным эффектом антиоксидантной активности хелаторов является способность ингибировать перекисное окисление липидов. Изучение этой реакции является частью решения более широкой проблемы, а именно изучения ферроптоза — запрограммированной гибели клеток. Этот механизм основан на окислении клеточной мембраны АКР, являющимися продуктами окислительно-восстановительных реакций с участием ионов железа [179;180]. На данный момент процесс ферроптоза достаточно хорошо изучен, однако остаются нерешенными вопросы, связанные с радикальными реакциями, протекающими в клеточной мембране, и влиянием различных антиоксидантов, в том числе хелаторов, на механизм этих реакций [50].

На данный момент существует множество различных методов изучения перекисного окисления липидов, подавляющее большинство из которых основано на обнаружении побочных продуктов окисления трихлоруксусной и 2-тиобарбитуровой кислот [181–184]. Преимущество метода ЯМР перед остальными состоит в возможности анализа отдельных функциональных групп и определении изменения концентраций как исходных веществ, так и продуктов реакции. Для более подробного анализа воздействия хелаторов на протекание радикальных процессов в липидных мембранах с участием ионов переходных

металлов было проведено сравнение антиоксидантных свойств хелаторов L1 и DFRX. Данные вещества являются сходными с точки зрения электродного потенциала ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = -0.60$  для DFRX и  $-0.62$  для L1) и констант равновесия ( $\text{Log } \beta_{\text{L1}} = 35$ ;  $\text{Log } \beta_{\text{DFRX}} = 27$ ) хелатных комплексов железа, поэтому представляет научный интерес сравнение их воздействия на систему перекисного окисления липидов с участием редокс активных ионов переходных металлов [81;185]. Из литературы известно, что DFRX также как L1 способен проявлять антиоксидантную активность в окислительно-восстановительных реакциях с участием ионов переходных металлов, однако механизм действия до сих пор описан не был [179;186]. В качестве модели для изучения влияния хелаторов на перекисное окисление липидов с участием ионов железа и меди была выбрана мицелла ЛК. Для анализа антиоксидантной активности хелаторов в данной системе были сняты  $^1\text{H}$  ЯМР спектры растворов мицелл ЛК с добавлением солей переходных металлов, а также  $\text{H}_2\text{O}_2$  в отсутствии и присутствии L1 и DFRX сразу после смешения и через 24 ч [187]. В качестве примеров на Рисунке 36 представлены фрагменты спектров смесей мицелл линолевой кислоты и соли металла в отсутствии и присутствии хелаторов L1 (Рисунок 36А) и DFRX (Рисунок 36Б) соответственно.



**Рисунок 36.** Химическая структура ЛК и фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров начальной реакционной смеси (ЛК 3.5мМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.5 М) в ФБ (рН 7.4) и продуктов окисления с участием соли металла через 24 часа после смешивания в отсутствии и присутствии хелатора. **А:** L1 (1 мМ),  $\text{CuCl}_2$  (0.1 мМ); **Б:** DFRX (1 мМ),  $\text{FeSO}_4$  (0.1 мМ). Температурные условия экспериментов: 25 °С.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker AVND-500. Протоны ЛК и соответствующие им сигналы на фрагментах спектров  $^1\text{H}$  ЯМР обозначены цифрами 1-4.

Видно, что в отсутствии хелаторов через 24 часа суммарная интенсивность сигнала протонов ЛК значительно снизилась. Кроме того, исчезли линии при 2,7 и 2,09 м.д., соответствующие протонам 1 и 2 вблизи двойных связей, а также появились линии, соответствующие продуктам реакций. Все вышеизложенное вместе с тем, что в ходе реакции образовался нерастворимый осадок, свидетельствует о практически полном расходе ЛК в растворе и образовании полимеров. Напротив, в присутствии L1 или DFRX через 24 часа интегральная интенсивность сигналов протонов 1, 2 и 3 практически не изменилась, что говорит об ингибировании реакции перекисного окисления мицелл ЛК. В присутствии DFRX через 24 часа после смешивания общий уровень сигнала также снижался, что свидетельствовало об образовании полимеров, но сигналы, соответствующие протонам вблизи двойных связей, полностью не исчезали. Это наблюдение свидетельствует о снижении скорости инициации окисления ЛК в присутствии DFRX.

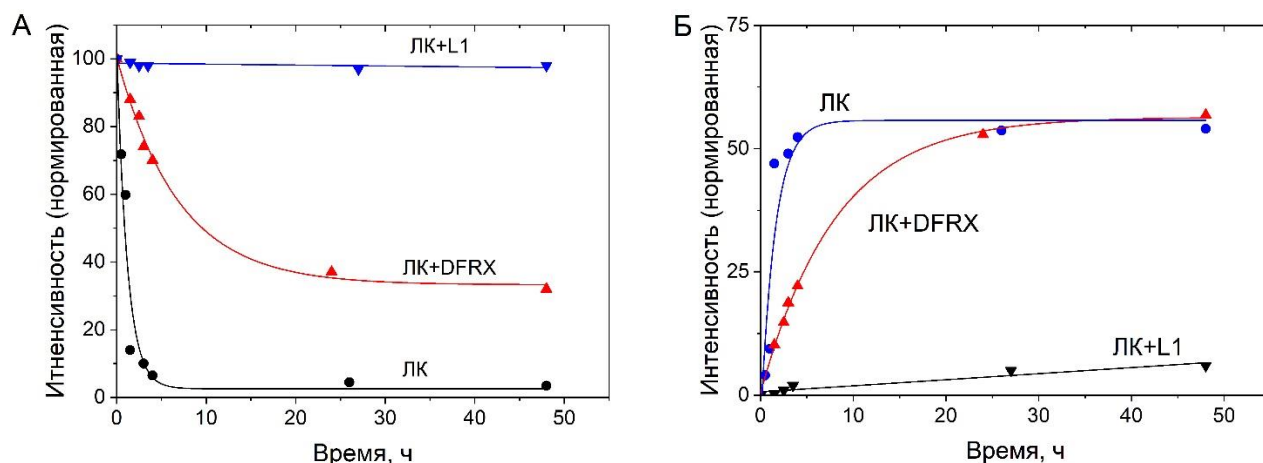
В данной работе не ставилась задача полного соотнесения всех сигналов ЯМР с соответствующими протонами продуктов окисления ЛК, поскольку перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот широко описано в литературе [188;189].

Известно, что реакция ЛК с  $\text{OH}^\bullet$  начинается с отрыва атома водорода из положения 1 (Уравнение 32, см. страницу 22) [190], и это наблюдение было использовано в настоящей работе для прямых измерений константы скорости стадии инициации. реакции. С другой стороны, снижение общей интегральной интенсивности сигнала ЯМР из-за образования полимеров, в частности по изменению интегральной интенсивности метильной группы ЛК, можно использовать для расчета констант скорости стадии обрыва (Уравнения 36-38, см. страницу 22).

Данные кинетики перекисного окисления мицелл ЛК в присутствии железа и меди были измерены в отсутствии и в присутствии L1 и DFRX. В качестве примеров на Рисунке 37 представлены изменения интенсивности сигналов на 2,7



м.д от первого протона и 0,9 м.д. от метильной группы ЛК при перекисном окислении с участием ионов железа в отсутствии и присутствии хелаторов [187].



**Рисунок 37. А:** Кинетика стадии инициации перекисного окисления ЛК (3,5 мМ), индуцированного  $\text{FeSO}_4$  (0,1 мМ) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 М) в присутствии и в отсутствии DFRX (2 мМ) и L1 (2 мМ). Исследования проводили при комнатной температуре, в буферном растворе (0,1 М) с рН 7,4. Графики построены по спаду интегрального сигнала интенсивности протонов ЛК при 2,7 м.д.; **Б:** Кинетика стадии обрыва реакции перекисного окисления ЛК (3,5 мМ) с образованием полимерных продуктов, индуцируемых  $\text{FeSO}_4$  (0,1 мМ) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 М) в отсутствие и в присутствии DFRX (2 мМ) и L1 (2 мМ). Графики построены согласно обратному изменению интегрального сигнала интенсивности протонов ЛК при 0,9 м.д. ( $I=100-I_{\text{CH}_3}$ ); Температурные условия экспериментов: 25 °С. Раствор: ФБ (0,1 М) с рН 7,4.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры были сняты на приборе Bruker AVHD-500.

Как видно из Рисунка 37А, скорость перекисного окисления ЛК, вызванного ионами железа, значительно снижается в присутствии хелатирующих препаратов L1 и DFRX. Кроме того, на этой молекулярной модели также можно показать, что антиоксидантная активность L1 в этой реакции перекисного окисления ЛК выше, чем у DFRX.

В случае исследования стадии обрыва реакции перекисного окисления ЛК (Рисунок 37Б) методика сбора и оценки данных основывалась на предыдущих наблюдениях, которые позволили предположить, что уменьшение интегральной интенсивности сигнала от метильной группы соответствует увеличению количества различных полимеров, образующихся в реакциях окисления (Уравнения 36-38, см. страницу 22). Как видно из Рисунка 37Б, скорость образования полимерных продуктов значительно снижается в присутствии хелаторов L1 и DFRX. В частности, в присутствии DFRX стадия полимеризации с обрывом цепи ограничивается стадией иницирования.

Полученные данные по изменению интегральной интенсивности сигналов ЛК, соответствующие стадиям терминации и инициации были экспоненциально аппроксимированы, а затем на основании параметров аппроксимации были рассчитаны наблюдаемые константы скорости реакции (Таблица 7) [187].

**Таблица 7** - Константы скорости инициации и терминации реакций перекисного окисления ЛК, индуцированных ионами железа и меди, в отсутствие и в присутствии DFRX и L1

Реакции с участием ионов железа	Константа скорости инициации, $\times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$	Константа скорости терминации, $\times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$
ЛК	$24.0 \pm 1$	$17.0 \pm 2$
ЛК + DFRX	$3.8 \pm 0.5$	$3.5 \pm 0.2$
ЛК + L1	$0.05 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.03$
Реакции с участием ионов меди		
ЛК	$10.0 \pm 2$	$4.2 \pm 0.8$
ЛК + DFRX	$3.0 \pm 1.0$	$13.0 \pm 5.0$
ЛК + L1	$0.02 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.01$

Результаты, представленные в Таблице 7 свидетельствуют о том, что DFRX ингибирует перекисное окисление ЛК в присутствии ионов железа и меди в 6 и 3 раза соответственно, тогда как L1 ингибирует перекисное окисление ЛК в аналогичных условиях примерно 500 раз. Известно, что окислительно-восстановительные потенциалы хелатных комплексов DFRX и L1 с железом очень близки [81], поэтому можно предположить, что причина наблюдаемых различий антиоксидантной активности в этой реакции может быть связана с различиями в липофильности этих хелаторов: коэффициент пропорциональности *n*-октанол/вода 0.19 для L1 и 6.3 для DFRX [185]. Также известно, что L1 и его железохелатные комплексы гидрофильны и могут располагаться вне мицелл ЛК. С другой стороны, DFRX и его железохелатные комплексы более липофильны и могут проникать в липидные ассоциаты непосредственно к основному реакционному центру (гидрофобному хвосту) [185]. Таким образом, сравнительный анализ антиоксидантной активности DFRX и L1 в перекисном окислении липидов показал более низкую эффективность DFRX по сравнению с L1.

## 6.2. Заключение к главе

В настоящем исследовании показано, что деферазирокс ингибирует перекисное окисление линолевой кислоты в мицеллах, однако антиоксидантный эффект этого хелатора значительно ниже, чем у деферипрона. Основная причина различия в антиоксидантной эффективности связана с гораздо более высокой липофильностью деферазирока, что позволяет этому хелатору, а также его хелатным комплексам проникать в мицеллы непосредственно к реакционному центру. Благодаря обратимости реакции комплексообразования хелатные комплексы могут разлагаться с выделением свободного иона металла. В результате свободный ион металла способен реагировать с перекисью водорода с образованием гидроксильных радикалов. Кроме того, можно отметить, что в случае деферазирока скорость перекисного окисления лимитируется стадией инициации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании выполненного исследования можно сформулировать следующие основные результаты и выводы:

- Рассчитаны стехиометрии, константы равновесия и экстинкции хелатных комплексов деферипрона с ионами Cu(II), Al(III), Zn(II) и Ca(II) в водных и спиртовых средах.
- Установлено, что деферипрон проявляет как электрон-донорные, так и электрон-акцепторные свойства в фотоиндуцированных реакциях. Описаны механизмы фотохимических реакций, структуры основных радикальных интермедиатов и первичных фотопродуктов. Установлено, что хелатирование металлов ускоряет фотодеградацию деферипрона.
- Показано, что деферипрон проявляет антиоксидантную активность и ингибирует генерацию гидроксильных радикалов в фотоиндуцированных реакциях и реакциях Фентона с участием ионов железа и меди. Механизм антиоксидантной активности имеет как энергетическую, так и стерическую природу.
- Установлено, что аскорбиновая кислота проявляет как антиоксидантную, так и про-оксидантную активность в реакции Фентона с участием ионов железа. На основании полученных данных была предложена структура смешанных хелатных комплексов  $[\text{FeL}_1\text{L}_2\text{Asc}]$ , стабильных в нейтральных растворах и разлагающихся в кислых средах.
- Показано, что деферипрон проявляет антиоксидантную активность в реакции перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди. Рассчитаны эффективные константы скорости инициации и терминации перекисного окисления линолевой кислоты. Показано, что деферипрон эффективней деферазирокса ингибирует перекисное окисление мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу выразить благодарность всем людям, которые помогли мне:

- Полякову Н.Э. – научному руководителю, вдохновителю и очень хорошему человеку;
- Селютиной О.Ю. – за консультации и помощь в проведении и анализе результатов ЯМР экспериментов с мицеллами;
- Кобзевой Т.В. – за помощь в проведении и анализе результатов ЭПР экспериментов;
- Яньшолу В.В. – за снятие масс-спектров продуктов фотохимических реакций;
- Рецензентам и оппонентам моих научных работ: Глебову Е.М., Стасю Д.В., Душкину А.В., Кирютину А.С., Бердинскому В.Л. и Бабайлову С.П. за ценные замечания.
- Своим учителям Дергунову В.В., Кравцову О.Н., Коркиной Р.А. за возвращение моего научного интереса и расширение кругозора;
- Маме, папе и бабушке за мотивацию и подталкиванию меня к оформлению этого труда;
- Моей жене и маленькой дочке за поддержку и стремление к саморазвитию, а также моим друзьям и знакомым за моральную поддержку.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ponka P., Beaumont C., Richardson D.R. Function and regulation of transferrin and ferritin // *Semin. Hematol.* 1998. Vol. 35, № 1. P. 35–54.
2. Steere A.N. et al. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. Vol. 1820, № 3. P. 326–333.
3. Nordberg G.F. et al. Handbook on the Toxicology of Metals // Handbook on the Toxicology of Metals. 3rd ed. / ed. Nordberg G.F. et al. Elsevier Inc, 2007. 1024 p.
4. Dzieżyc-Jaworska K., Litwin T., Członkowska A. Clinical manifestations of Wilson disease in organs other than the liver and brain // *Ann. Transl. Med.* 2019. Vol. 7, № 2. P. 62.
5. Denisov E.T., Afanas'ev I.B. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Abingdon, UK: Taylor & Francis, 2005. 981 p.
6. Traber M.G., Stevens J.F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 51, № 5. P. 1000–1013.
7. Kontoghiorghes G.J. Prospects for introducing deferiprone as potent pharmaceutical antioxidant. // *Front. Biosci. (Elite Ed).* 2009. Vol. 1. P. 161–178.
8. Nayak S., Dash A.C. Phenol-amide chelates of iron(III). Kinetics and mechanism of reversible formation of (diaqua) (1,3) bis (2-hydroxybenzamido)propaneiron(III) and its reactions with thiocyanate, azide, imidazole, sulphur(IV) and ascorbic acid in aqueous medium // *Indian J. Chem. - Sect. A.* 2003. Vol. 42, № 9. P. 2427–2438.
9. Rath H., Pradhan G.C., Dash A.C. Phenol-amide chelate of iron(III): Its redox activity with L-ascorbic acid // *Indian J. Chem. - Sect. A.* 2001. Vol. 40, № 5. P. 437–441.
10. Nurchi V.M. et al. Potentiometric, spectrophotometric and calorimetric study on iron(III) and copper(II) complexes with 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone // *J.*

- Inorg. Biochem. Elsevier, 2008. Vol. 102, № 4. P. 684–692.
11. Patrice T., Moan J., Peng Q. An outline of the history of PDT // Photodynamic Therapy. Royal Society of Chemistry, 2003. P. 1–18.
  12. Anderson G.J., Frazer D.M. Current understanding of iron homeostasis // Am. J. Clin. Nutr. 2017. Vol. 106. P. 1559–1566.
  13. McLean E. et al. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005 // Public Health Nutr. 2009. Vol. 12, № 4. P. 444–454.
  14. Weatherall D.J., Clegg J.B. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem // Bull. World Health Organ. 2001. Vol. 79, № 8. P. 704–712.
  15. Kontoghiorghes G.J. How to manage iron toxicity in post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? // Expert Rev. Hematol. 2020. Vol. 13, № 4. P. 299–302.
  16. Rees D.C., Williams T.N., Gladwin M.T. Sickle-cell disease // Lancet. 2010. Vol. 376, № 9757. P. 2018–2031.
  17. Holm R.H., Kennepohl P., Solomon E.I. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology // Chem. Rev. 1996. Vol. 96, № 7. P. 2239–2314.
  18. Erdman J.W., MacDonald I.A., Zeisel S.H. Present Knowledge in Nutrition: Tenth Edition // Present Knowledge in Nutrition: Tenth Edition. 10th ed. / ed. Erdman J.W., MacDonald I., Zeisel S.H. Washington DC: Wiley, 2012. 1305 p.
  19. Prohaska J.R. Impact of Copper Limitation on Expression and Function of Multicopper Oxidases (Ferroxidases) // Adv. Nutr. 2011. Vol. 2, № 2. P. 89–95.
  20. Vashchenko G., MacGillivray R. Multi-Copper Oxidases and Human Iron Metabolism // Nutrients. 2013. Vol. 5, № 7. P. 2289–2313.
  21. Daniel K.G. et al. Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. // Front. Biosci. 2004. Vol. 9. P. 2652–2662.
  22. Milburn R.M., Vosburgh W.C. A Spectrophotometric Study of the Hydrolysis of Iron(III) Ion. II. Polynuclear Species // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 1955. Vol. 77, № 5. P. 1352–1355.
  23. Knight R.J., Sylva R.N. Spectrophotometric investigation of iron(III) hydrolysis in

- light and heavy water at 25°C // *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1975. Vol. 37, № 3. P. 779–783.
24. Gallard H., De Laat J., Legube B. Spectrophotometric study of the formation of iron(III)-hydroperoxy complexes in homogeneous aqueous solutions // *Water Res.* 1999. Vol. 33, № 13. P. 2929–2936.
  25. De Laat J., Gallard H. Catalytic decomposition of hydrogen peroxide by Fe (III) in homogeneous aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling // *Environ. Sci. Technol.* 1999. Vol. 33, № 16. P. 2726–2732.
  26. Gallard H., De Laat J., Legube B. Effect of pH on the oxidation rate of organic compounds by FeII/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mechanisms and simulation // *New J. Chem.* 1998. Vol. 22, № 3. P. 263–268.
  27. Stuglik Z., Paweł Zagórski Z. Pulse radiolysis of neutral iron(II) solutions: oxidation of ferrous ions by OH radicals // *Radiat. Phys. Chem.* 1981. Vol. 17, № 4. P. 229–233.
  28. Christensen H., Sehested K., Corfitzen H. Reactions of hydroxyl radicals with hydrogen peroxide at ambient and elevated temperatures // *J. Phys. Chem.* 1982. Vol. 86, № 9. P. 1588–1590.
  29. Jayson G.G., Parsons B.J., Swallow A.J. Oxidation of ferrous ions by perhydroxyl radicals // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases.* 1973. Vol. 69. P. 236–242.
  30. Rush J.D., Bielski B.H.J. Pulse radiolytic studies of the reactions of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with Fe(II)/Fe(III) ions. The reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with ferric ions and its implication on the occurrence of the Haber-Weiss reaction // *J. Phys. Chem.* 1985. Vol. 89, № 23. P. 5062–5066.
  31. Rothschild W.G., Allen A.O. Studies in the Radiolysis of Ferrous Sulfate Solutions: III. Air-Free Solutions at Higher pH // *Radiat. Res.* 1958. Vol. 8, № 2. P. 101–110.
  32. Bielski B.H.J. et al. Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radicals in Aqueous Solution // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1985. Vol. 14, № 4. P. 1041–1100.
  33. Sehested K., Rasmussen O.L., Fricke H. Rate constants of OH with HO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and



- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> from hydrogen peroxide formation in pulse-irradiated oxygenated water // *J. Phys. Chem.* 1968. Vol. 72, № 2. P. 626–631.
34. Pham A.N., Rose A.L., Waite T.D. Kinetics of Cu(II) reduction by natural organic matter // *J. Phys. Chem. A.* 2012. Vol. 116, № 25. P. 6590–6599.
35. Zafiriou O.C., Voelker B.M., Sedlak D.L. Chemistry of the superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) in seawater: Reactions with inorganic copper complexes // *J. Phys. Chem. A.* 1998. Vol. 102, № 28. P. 5693–5700.
36. Ulanski P., von Sonntag C. Stability constants and decay of aqua-copper(III) - A study by pulse radiolysis with conductometric and optical detection // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2000. Vol. 6. P. 1211–1217.
37. Pham A.N. et al. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production // *J. Catal.* 2013. Vol. 301. P. 54–64.
38. Delangle P., Mintz E. Chelation therapy in Wilson's disease: from d-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(I) chelators // *Dalt. Trans.* 2012. Vol. 41, № 21. P. 6359–6370.
39. Moffett J.W., Zika R.G. Reaction Kinetics of Hydrogen Peroxide with Copper and Iron in Seawater // *Environ. Sci. Technol.* 1987. Vol. 21, № 8. P. 804–810.
40. Benkelberg H.J., Warneck P. Photodecomposition of iron(III) hydroxo and sulfato complexes in aqueous solution: Wavelength dependence of OH and SO<sub>4</sub><sup>-</sup> quantum yields // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 99. P. 5214–5221.
41. Hossain M.M., Rasel M.R.I., Islam M.S. Photodegradation of Orange Green by Fe(III)–Aqua Complex // *Dhaka Univ. J. Sci.* 2012. Vol. 60, № 1. P. 43–46.
42. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Editorial: Free Radicals and Antioxidant Protection: Mechanisms and Significance in Toxicology and Disease // *Hum. Exp. Toxicol.* 1988. Vol. 7, № 1. P. 7–13.
43. Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress // *Physiol. Res. Physiol Res*, 2010. Vol. 59, № 4. P. 459–469.
44. Santucci R. et al. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate // *Int. J. Biol. Macromol. Int J Biol Macromol*, 2019. Vol. 136. P.

- 1237–1246.
45. Speer R.E. et al. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by “antioxidant” metal chelators: From ferroptosis to stroke // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 62. P. 26–36.
  46. Yan N., Zhang J.J. Iron Metabolism, Ferroptosis, and the Links With Alzheimer’s Disease // *Front. Neurosci.* 2020. Vol. 13. P. 1443.
  47. Martinet W. et al. Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis // *Front. Pharmacol.* 2019. Vol. 10. P. 306.
  48. Ravingerová T. et al. The Molecular Mechanisms of Iron Metabolism and Its Role in Cardiac Dysfunction and Cardioprotection // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 21. P. 7889.
  49. Valko M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007. Vol. 39, № 1. P. 44–84.
  50. Stoyanovsky D.A. et al. Iron catalysis of lipid peroxidation in ferroptosis: Regulated enzymatic or random free radical reaction? // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. Vol. 133. P. 153–161.
  51. van Rooijen N. Liposomes // *Encyclopedia of Immunology*. Second / ed. Delves J. Peter. Elsevier, 1998. P. 1588–1592.
  52. Alexander-Bryant A.A., Vanden Berg-Foels W.S., Wen X. Bioengineering Strategies for Designing Targeted Cancer Therapies // *Adv. Cancer Res.* 2013. Vol. 118. P. 1–59.
  53. Dufourc E.J. Bicelles and nanodiscs for biophysical chemistry // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2021. Vol. 1863, № 1. P. 183478.
  54. Mihaljević B. et al. Linoleic acid peroxidation vs. isomerization: a biomimetic model of free radical reactivity in the presence of thiols // *Org. Biomol. Chem.* 2011. Vol. 9, № 9. P. 3541–3548.
  55. Turan B. Role of Antioxidants in Redox Regulation of Diabetic Cardiovascular Complications // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010. Vol. 11, № 8. P. 819–836.
  56. Ferrari G.S.L., Ferrari C.K.B. Exercise modulation of total antioxidant capacity (TAC): Towards a molecular signature of healthy aging // *Front. Life Sci.* 2011.

- Vol. 5, № 3–4. P. 81–90.
57. Kim W.Y. et al. Combined vitamin C, hydrocortisone, and thiamine therapy for patients with severe pneumonia who were admitted to the intensive care unit: Propensity score-based analysis of a before-after cohort study // *J. Crit. Care.* 2018. Vol. 47. P. 211–218.
58. Fowler A.A. et al. Effect of Vitamin C Infusion on Organ Failure and Biomarkers of Inflammation and Vascular Injury in Patients with Sepsis and Severe Acute Respiratory Failure: The CITRIS-ALI Randomized Clinical Trial // *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 2019. Vol. 322, № 13. P. 1261–1270.
59. Carr A.C. et al. Hypovitaminosis C and vitamin C deficiency in critically ill patients despite recommended enteral and parenteral intakes // *Crit. Care.* 2017. Vol. 21, № 1. P. 300.
60. Macan A.M., Kraljević T.G., Raić-malić S. Therapeutic perspective of vitamin C and its derivatives // *Antioxidants.* 2019. Vol. 8, № 8. P. 247.
61. Naidu K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview // *Nutr. J.* 2003. Vol. 2. P. 7.
62. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health // *Int. J. Biomed. Sci.* 2008. Vol. 4, № 2. P. 89–96.
63. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. // *Clin. Interv. Aging.* 2007. Vol. 2, № 2. P. 219–236.
64. Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid // *Radiat. Res.* 1996. Vol. 145, № 5. P. 532–541.
65. Bielski B.H.J. Chemistry of Ascorbic Acid Radicals // *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses.* ACS Public / ed. Seib P.A., Tolbert B.M. Washington, DC, USA: Advances in Chemistry, 1982. P. 81–100.
- 66.** Kontoghiorghes G.J. et al. Trying to Solve the Puzzle of the Interaction of Ascorbic Acid and Iron: Redox, Chelation and Therapeutic Implications // *Medicines.* 2020. Vol. 7. P. 45.
67. Erdem G. et al. Free radical mediated interaction of ascorbic acid and ascorbate/Cu(II) with viral and plasmid DNAs // *J. Biosci.* 1994. Vol. 19. P. 9–17.

68. Carr A., Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? // *FASEB J.* 1999. Vol. 13, № 9. P. 1007–1024.
69. Zümreoglu-Karan B. The coordination chemistry of Vitamin C: An overview // *Coord. Chem. Rev.* 2006. Vol. 250, № 17–18. P. 2295–2307.
70. Grillet L. et al. Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 5. P. 2515–2525.
71. Keypour H. et al. Studies on the reactions of ferric iron with ascorbic acid. A study of solution chemistry using Mössbauer spectroscopy and stopped-flow techniques // *Inorganica Chim. Acta.* 1986. Vol. 125, № 2. P. 97–106.
72. Yuan X. et al. Effects of pH, chloride, and bicarbonate on Cu(I) oxidation kinetics at circumneutral pH // *Environ. Sci. Technol.* 2012. Vol. 46, № 3. P. 1527–1535.
73. Mahata S. et al. Speciation study of L-ascorbic acid and its chelated Cu(II) & Ni(II) complexes: An experimental and theoretical model of complex formation // *South African J. Chem.* 2019. Vol. 72. P. 229–236.
74. Bhatt V. *Basic Organometallic Chemistry // Essentials of Coordination Chemistry.* 1st ed. Academic Press, 2015. P. 173–190.
75. Скопенко В.В. et al. Координационная химия / ed. Минкин В.И., Шевельков А.В. Москва: ИКЦ «АКАДЕМКНИГА», 2007. 489 p.
76. Salgado P. et al. Fenton reaction driven by iron ligands // *J. Chil. Chem. Soc.* 2013. Vol. 58, № 4. P. 2096–2101.
77. Halliwell B., Gutteridge J.M., Cross C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? // *J. Lab. Clin. Med.* 1992. Vol. 119, № 6. P. 598–620.
78. Zhu H. et al. Doxorubicin Redox Biology: Redox Cycling, Topoisomerase Inhibition, and Oxidative Stress // *React. Oxygen Species.* 2016. Vol. 1, № 3. P. 189–198.
79. Frankel E.N. *Phenolic Antioxidant // Lipid Oxidation.* Second. Urbana, USA: Elsevier, 2005. P. 209–258.
80. Bebbington D. et al. 3,5-Disubstituted-4-hydroxyphenyls linked to 3-hydroxy-2-methyl-4(1H)-pyridinone: potent inhibitors of lipid peroxidation and cell toxicity

- // J. Med. Chem. 2000. Vol. 43, № 15. P. 2779–2782.
81. Koppenol W.H., Hider R.H. Iron and redox cycling. Do's and don'ts // Free Radic. Biol. Med. 2019. Vol. 133. P. 3–10.
82. Koppenol W.H., Stanbury D.M., Bounds P.L. Electrode potentials of partially reduced oxygen species, from dioxygen to water // Free Radic. Biol. Med. 2010. Vol. 49, № 3. P. 317–322.
- 83. Timoshnikov V.A.** et al. Mechanistic Insights of Chelator Complexes with Essential Transition Metals: Antioxidant/Pro-Oxidant Activity and Applications in Medicine // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 3. P. 1247.
84. Ahmad I. et al. Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products // Int. J. Photoenergy. 2016. Vol. 2016, № 7. P. 1–19.
85. Girotti A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems // Photochem. Photobiol. 1990. Vol. 51, № 4. P. 497–509.
86. Ageeva A. et al. Peculiarities of Electron Transfer in Chiral Linked Systems // Chirality from Molecular Electronic States / ed. Akitsu T. Rijeka: IntechOpen, 2018.
87. Gomes A.T.P.C., Neves M.G.P.M., Cavaleiro J.A.S. Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives // An. Acad. Bras. Cienc. 2018. Vol. 90, № 2. P. 993–1026.
88. Glass B. Photostability of Drugs and Drug Products // CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology. Third / ed. Griesbeck A., Oelgemoller M., Ghetti F. CRC Press, 2012. Vol. 2016, № 0. P. 1003–1028.
89. Glebov E.M. et al. Intermediates in photochemistry of Fe(III) complexes with carboxylic acids in aqueous solutions // Photochem. Photobiol. Sci. 2011. Vol. 10, № 3. P. 425–430.
90. Pozdnyakov I.P. et al. Primary photoprocesses for Fe(III) complexes with citric and glycolic acids in aqueous solutions // J. Photochem. Photobiol. A Chem. 2023. Vol. 434. P. 114274.
91. Bernhoft R.A. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature // J. Environ. Public Health. 2012. Vol. 2012. P. 460508.

92. Mitra P. et al. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2017. Vol. 54, № 7–8. P. 506–528.
93. Cao Y. et al. Chelation therapy in intoxications with mercury, lead and copper // *J. trace Elem. Med. Biol.* 2015. Vol. 31. P. 188–192.
94. Shah N.R. Advances in iron chelation therapy: transitioning to a new oral formulation // *Drugs Context.* 2017. Vol. 6. P. 212502.
95. Fibach E., Rachmilewitz E.A. Iron overload in hematological disorders // *Press. medicale.* 2017. Vol. 46, № 12. P. 296–305.
96. Kontoghiorghes C.N., Kontoghiorghes G.J. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes // *Drug Des. Devel. Ther.* 2016. Vol. 10. P. 465–481.
97. Entezari S. et al. Iron Chelators in Treatment of Iron Overload // *J. Toxicol.* 2022. Vol. 2022. P. 4911205.
98. Chaves S. et al. Hydroxypyridinone Derivatives: A Fascinating Class of Chelators with Therapeutic Applications - An Update // *Curr. Med. Chem.* 2017. Vol. 25, № 1. P. 97–112.
99. Kontoghiorghes G.J. et al. Effective chelation of iron in  $\beta$  thalassaemia with the oral chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one // *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* 1987. Vol. 295, № 6612. P. 1509–1512.
100. Kolnagou A., Kleanthous M., Kontoghiorghes G.J. Reduction of body iron stores to normal range levels in thalassaemia by using a deferiprone/deferoxamine combination and their maintenance thereafter by deferiprone monotherapy // *Eur. J. Haematol.* 2010. Vol. 85, № 5. P. 430–438.
101. Kontoghiorghes G.J. The design of orally active iron chelators for the treatment of thalassaemia. University of Essex, Colchester UK, 1982. 1–243 p.
102. Santos M.A., Marques S.M., Chaves S. Hydroxypyridinones as “privileged” chelating structures for the design of medicinal drugs // *Coord. Chem. Rev.* 2012. Vol. 256, № 1–2. P. 240–259.
103. Kontoghiorghes G.J. Regulatory molecules and chelators used for the control of

- essential and toxic metals in health and disease: From molecular interactions to clinical effects and applications // *Curr. Med. Chem.* 2005. Vol. 12, № 23. P. 2661–2662.
104. Sheppard L.N., Kontoghiorghes G.J. Competition between deferiprone, desferrioxamine and other chelators for iron and the effect of other metals // *Arzneimittelforschung.* 1993. Vol. 43, № 6. P. 659–663.
105. Kontoghiorghes G. et al. Advances in Iron Overload Therapies. Prospects for Effective Use of Deferiprone (L1), Deferoxamine, the New Experimental Chelators ICL670, GT56-252, L1NAll and their Combinations // *Curr. Med. Chem.* 2005. Vol. 12, № 23. P. 2663–2681.
106. Kontoghiorghes G.J. Orally active alpha-ketohydroxypyridine iron chelators: effects on iron and other metal mobilisations // *Acta Haematol.* 1987. Vol. 78, № 2–3. P. 212–216.
107. El-Jammal A., Templeton D.M. Iron-hydroxypyridone redox chemistry: Kinetic and thermodynamic limitations to Fenton activity // *Inorganica Chim. Acta.* 1996. Vol. 245, № 2. P. 199–207.
108. Merkofer M. et al. Redox properties of the iron complexes of orally active iron chelators CP20, CP502, CP509, and ICL670 // *Helv. Chim. Acta.* 2004. Vol. 87. P. 3021–3034.
109. Kontoghiorghes G.J. et al. Chelators controlling metal metabolism and toxicity pathways: applications in cancer prevention, diagnosis and treatment // *Hemoglobin.* 2008. Vol. 32, № 1–2. P. 217–227.
110. Murakami K., Yoshino M. Generation of reactive oxygen species by hydroxypyridone compound/iron complexes // *Redox Rep.* 2020. Vol. 25, № 1. P. 59–63.
111. Fiorillo M. et al. Deferiprone (DFP) Targets Cancer Stem Cell (CSC) Propagation by Inhibiting Mitochondrial Metabolism and Inducing ROS Production // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 6. P. 1529.
112. Geleta B. et al. Breaking the cycle: Targeting of NDRG1 to inhibit bi-directional oncogenic cross-talk between pancreatic cancer and stroma // *FASEB J.* 2021.

- Vol. 35, № 2. P. e21347.
113. Verhagen J., Vliegenthart J.F.G., Boldingh J. Micelle and acid-soap formation of linoleic acid and 13-L-hydroperoxylinoleic acid being substrates of lipoxygenase-1 // *Chem. Phys. Lipids*. 1978. Vol. 22, № 4. P. 255–259.
  114. Zhu T.F., Budin I., Szostak J.W. Preparation of Fatty Acid Micelles // *Methods Enzymol*. 2013. Vol. 533. P. 283–288.
  115. Панюшкин В.Т. et al. Ядерный магнитный резонанс в структурных исследованиях / ed. Сагдеев Р.З. Москва: КРАСАНД, 2017. 352 p.
  116. Давиденко Н.К., Билзиля В.А., Головнова П.П. Взаимодействие трис-3-дикетонатов лантаноидов с макроциклическими эфирами // *Координационная Химия*. 1980. Vol. 6, № 10. P. 1531–1537.
  117. Reuben J. Complex Formation between Eu(fod)<sub>3</sub>, a Lanthanide Shift Reagent, and Organic Molecules // *J. Am. Chem. Soc.* 1973. Vol. 95, № 11. P. 3534–3540.
  118. Hofer O. The Lanthanide Induced Shift Technique: Applications in Conformational Analysis // *Topics in Stereochemistry* / ed. Allinger N.L., Eliel E.L. John Wiley & Sons, Ltd, 1976. Vol. 9. P. 111–197.
  119. Gans P., Irving H.M.N.H. The calculation of stability constants of weak complexes from spectrophotometric data // *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1972. Vol. 34, № 6. P. 1885–1890.
  120. Lüders K., Salikhov K.M. Spin polarization and magnetic field effects in radical pairs. Short-time perturbational treatment taking into account isotropic and anisotropic magnetic interactions // *Chem. Phys.* 1989. Vol. 137, № 1–3. P. 51–65.
  121. Polyakov N.E. et al. CIDNP and EPR study of phototransformation of lappaconitine derivatives in solution // *J. Phys. Chem. B*. 2010. Vol. 114, № 13. P. 4646–4651.
  122. Magin I.M. et al. Spin effects in intramolecular electron transfer in naproxen-N-methylpyrrolidine dyad // *Chem. Phys. Lett.* 2011. Vol. 516, № 1–3. P. 51–55.
  123. Andreu I. et al. Examples for biological reactivity involving free radicals followed by CIDNP // *Mol. Phys.* 2013. Vol. 111, № 18–19. P. 2992–2998.



124. Morozova O.B. et al. Time-resolved CIDNP: An NMR way to determine the EPR parameters of elusive radicals // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. Vol. 13. P. 6619–6627.
125. Круппа А.И. Химическая поляризация ядер в реакциях фотоиндуцированного переноса электрона. Новосибирск, 1994. 155 p.
126. Kaptein R. Simple rules for chemically induced dynamic nuclear polarization // *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* The Royal Society of Chemistry, 1971. № 14. P. 732–733.
127. Dikalov S., Kirilyuk I., Grigor'ev I. Spin trapping of O-, C-, and S-centered radicals and peroxyxynitrite by 2H-imidazole-1-oxides // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 218, № 2. P. 616–622.
128. Haseloff R.F. et al. Synthesis and spin trapping applications of 2,2-dimethyl-d6-4-methyl-2H-imidazole-1-oxide-1-15N // *Free Radic. Res.* 1997. Vol. 26, № 2. P. 159–168.
129. Fufezan C., Rutherford A.W., Krieger-Liszky A. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 532, № 3. P. 407–410.
130. Karogodina T.Y., Sergeeva S. V., Stass D. V. Stability and reactivity of free radicals: A physicochemical perspective with biological implications // *Hemoglobin.* 2011. Vol. 35, № 3. P. 262–275.
131. Jakusch T. et al. Solution equilibrium characterization of insulin-mimetic Zn(II) complexes // *J. Inorg. Biochem.* 2006. Vol. 100, № 9. P. 1521–1526.
132. Pashalidis I., Kontoghiorghes G.J. Molecular factors affecting the complex formation between deferiprone (L1) and Cu(II). Possible implications on efficacy and toxicity // *Arzneimittelforschung.* 2001. Vol. 51, № 12. P. 998–1003.
133. Pashalidis I., Kontoghiorghes G.J. Competition studies of L1-deferiprone with copper and iron. Possible implications on efficacy, toxicity and new therapeutic applications // *Transfus. Sci.* 2000. Vol. 23, № 3. P. 259–261.
134. Jomova K. et al. Protective role of quercetin against copper(II)-induced oxidative stress: A spectroscopic, theoretical and DNA damage study // *Food Chem. Toxicol.* 2017. Vol. 110. P. 340–350.

135. Zhang L. et al. A Cu II -based Metal-Organic Framework as an Efficient Photocatalyst for Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol in Aqueous Solution // *Asian J. Org. Chem.* 2018. Vol. 7, № 1. P. 165–170.
- 136. Timoshnikov V.A.** et al. Effective inhibition of copper-catalyzed production of hydroxyl radicals by deferiprone // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2019. Vol. 24, № 3. P. 331–341.
137. Yadegari H. et al. Electrochemistry of deferiprone as an orally active iron chelator and HIV-1 replication inhibitor and its determination // *J. Braz. Chem. Soc.* 2008. Vol. 19, № 5. P. 1017–1022.
138. Moffett J.W., Zika R.G. Oxidation kinetics of Cu(I) in seawater: implications for its existence in the marine environment // *Mar. Chem.* 1983. Vol. 13, № 3. P. 239–251.
- 139. Timoshnikov V.A.** et al. Photoinduced transformation of iron chelator deferiprone: Possible implications in drug metabolism and toxicity // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2014. Vol. 289. P. 14–21.
140. Shim S.C., Hammond G.. Photochemistry of N-methyl-4-pyridone // *Biochem. J.* 1976. Vol. 9. P. 181–191.
141. Pozdnyakov I.P. et al. Photochemistry of Fe(III) complexes with salicylic acid derivatives in aqueous solutions // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2015. Vol. 307–308. P. 9–15.
142. Polyakov N.E. et al. The mechanisms of oxidation of NADH analogues 3. Stimulated nuclear polarization (SNP) and chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP) in low magnetic fields in photo-oxidation reactions of 1,4-dihydropyridines with quinones // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 1993. Vol. 74, № 1. P. 75–79.
143. Salomatova V.A. et al. Photodegradation of 4,4-Bis(4-hydroxyphenyl)valeric acid and its inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2014. Vol. 274. P. 27–32.
144. Polyakov N.E. et al. The mechanism of oxidation of NADH analogues 4. Photooxidation of N-acetyl-substituted 1,4-dihydropyridine in the presence of

- quinones // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 1997. Vol. 111, № 1–3. P. 61–64.
145. Hore P.J. et al. Photoreduction of Flavin by NADH. A Flash Photolysis Photo-CIDNP Study // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. Vol. 104, № 23. P. 6262–6267.
146. Kruppa A.I. et al. The mechanisms of the oxidation of NADH analogues 2. N-Methyl-substituted 1,4-dihydropyridines // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 1993. Vol. 73, № 2. P. 159–163.
147. Sherin P.S., Snytnikova O.A., Tsentalovich Y.P. Tryptophan photoionization from prefluorescent and fluorescent states // *Chem. Phys. Lett.* 2004. Vol. 391, № 1–3. P. 44–49.
148. Tsentalovich Y.P. et al. Kinetics and Mechanism of the Photochemical Reaction of 2,2'-Dipyridyl with Tryptophan in Water: Time-Resolved CIDNP and Laser Flash Photolysis Study // *J. Phys. Chem. A.* 1999. Vol. 103, № 27. P. 5362–5368.
149. Bokare A.D., Choi W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes // *J. Hazard. Mater.* 2014. Vol. 275. P. 121–135.
150. Sillanpää M. Environmental fate of EDTA and DTPA // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1997. Vol. 152. P. 85–111.
- 151. Timoshnikov V.A.** et al. Inhibition of Fe<sup>2+</sup>- and Fe<sup>3+</sup>- induced hydroxyl radical production by the iron-chelating drug deferiprone // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 78. P. 118–122.
152. Makino K. et al. DMPO spin trapping in the presence of Fe ion // *Free Radic. Res.* 1990. Vol. 9, № 3–6. P. 233–240.
153. Buettner G.R. Spin Trapping - ESR parameters of spin adducts // *Free Radic. Biol. Med.* 1987. Vol. 3, № 4. P. 259–303.
154. Zhang Y.K., Maples K.R. Synthesis and EPR evaluation of the nitron PBN-[tert-<sup>13</sup>C] for spin trapping competition // *Zeitschrift für Naturforsch. B.* 2002. Vol. 57, № 1. P. 127–131.
155. Ebersson L. Spin Trapping and Electron Transfer // *Adv. Phys. Org. Chem.* 1999. Vol. 31. P. 91–141.
156. Buettner G.R. Spin trapping of hydroxyl radical // *Handbook of methods of*

- oxygen radical research / ed. Greenwald R.A. Boca Raton: CRC Press, 1986. P. 151–155.
157. Motekaitis R.J., Martell A.E. Stabilities of the iron(III) chelates of 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone and related ligands // *Inorganica Chim. Acta*. 1991. Vol. 183, № 1. P. 71–80.
158. Mostert L.J. et al. Free radical and cytotoxic effects of chelators and their iron complexes in the hepatocyte // *Free Radic. Res.* 1987. Vol. 3, № 6. P. 379–388.
159. Kontoghiorghes G.J., Jackson M.J., Lunec J. In vitro screening of iron chelators using models of free radical damage // *Free Radic. Res. Commun.* 1986. Vol. 2, № 1–2. P. 115–124.
160. Quintero B., Miranda M.A. Mechanisms of photosensitization induced by drugs: A general survey // *Ars Pharm.* 2000. Vol. 41, № 1. P. 27–46.
161. Merkofer M. et al. Dissociation of CP20 from iron(II)(cp20)<sub>3</sub>: A pulse radiolysis study // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006. Vol. 2006, № 3. P. 671–675.
162. Merkofer M. et al. Fenton chemistry and iron chelation under physiologically relevant conditions: Electrochemistry and kinetics // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. Vol. 19. P. 1263–1269.
163. Devanur L.D., Neubert H., Hider R.C. The Fenton Activity of Iron(III) in the Presence of Deferiprone // *J. Pharm. Sci.* 2008. Vol. 97, № 4. P. 1454–1467.
164. Kontoghiorghes G.J., Sheppard L., Chambers S. New synthetic approach and iron chelating studies of 1-alkyl-2-methyl-3-hydroxypyrid-4-ones. // *Arzneimittelforsch. Drug Res.* 1987. Vol. 37, № 10. P. 1099–1102.
165. Kontoghiorghes C.N., Kolnagou A., Kontoghiorghes G.J. Antioxidant targeting by deferiprone in diseases related to oxidative damage // *Front. Biosci.* 2014. Vol. 19, № 6. P. 862–885.
166. Breuer W., Hershko C., Cabantchik Z.I. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism // *Transfus. Sci.* 2000. Vol. 23, № 3. P. 185–192.
167. Goodman B.A., Severino J.F., Pirker K.F. Reactions of green and black teas with Cu(ii) // *Food Funct.* 2012. Vol. 3, № 4. P. 399–409.

168. Beniazza R. et al. Effective ascorbate-free and photolabile click reactions in water using a photoreducible copper(II)-ethylenediamine precatalyst // *Beilstein J. Org. Chem.* 2015. Vol. 11. P. 1950–1959.
169. Hamulakova S. et al. Targeting copper(II)-induced oxidative stress and the acetylcholinesterase system in Alzheimer's disease using multifunctional tacrine-coumarin hybrid molecules // *J. Inorg. Biochem.* 2016. Vol. 161. P. 52–62.
170. Ohnishi S., Mizutani H., Kawanishi S. The enhancement of oxidative DNA damage by anti-diabetic metformin, buformin, and phenformin, via nitrogen-centered radicals // *Free Radic. Res.* 2016. Vol. 50, № 8. P. 929–937.
171. Szczepanik W. et al. Copper(II) binding by kanamycin A and hydrogen peroxide activation by resulting complexes // *New J. Chem.* 2002. Vol. 26, № 10. P. 1507–1514.
172. Krupa K. et al. Copper(II) complexes with *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA: Coordination pattern, physicochemical properties and reactivity // *J. Inorg. Biochem.* 2018. Vol. 189. P. 69–80.
173. Krainev A.G., Williams T.D., Bigelow D.J. Oxygen-centered spin adducts of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) and 2H-imidazole 1-oxides. // *J. Magn. Reson. B.* 1996. Vol. 111, № 3. P. 272–280.
174. Bielski B.H.J., Allen A.O., Schwarz H.A. Mechanism of Disproportionation of Ascorbate Radicals // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. Vol. 103, № 12. P. 3516–3518.
- 175. Timoshnikov V.A.** et al. Redox interactions of vitamin c and iron: Inhibition of the pro-oxidant activity by deferiprone // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 11. P. 3967.
176. Vásquez-Vivar J. et al. Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascorbyl, albumin-thiyl and uric acid-derived free radicals // *Biochem. J.* 1996. Vol. 314, № 3. P. 869–876.
177. Simpson G.L.W., Ortwerth B.J. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. Vol. 1501, № 1. P. 12–24.
178. Nishikawa Y., Toyoshima Y., Kurata T. Identification of 3,4-Dihydroxy-2-oxo-

- butanal (L-threosone) as an Intermediate Compound in Oxidative Degradation of Dehydro-L-ascorbic Acid and 2,3-Diketo-L-Gulonic Acid in a Deuterium Oxide Phosphate Buffer // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. Vol. 65, № 8. P. 1707–1712.
179. Qiu Y. et al. The Application of Ferroptosis in Diseases // *Pharmacol. Res.* 2020. Vol. 159. P. 104919.
180. Cao J.Y., Dixon S.J. Mechanisms of ferroptosis // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. Vol. 73, № 11–12. P. 2195–2209.
181. Chaves S. et al. Hydroxy(thio)pyrone and hydroxy(thio)pyridinone iron chelators: Physico-chemical properties and anti-oxidant activity // *J. Inorg. Biochem.* 2012. Vol. 114. P. 38–46.
182. Myers C.E. et al. Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response // *Science* (80-. ). 1977. Vol. 197, № 4299. P. 165–167.
183. Bakır T., Sönmezoglu İ., Apak R. Quantification of Antioxidant Ability Against Lipid Peroxidation with an ‘Area Under Curve’ Approach // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2017. Vol. 94, № 1. P. 77–88.
184. Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review // *Pathol. Biol.* 1996. Vol. 44, № 1. P. 25–28.
185. Kontoghiorghes G.J., Kontoghiorghe C.N. Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 6. P. 1456.
186. Rahdar A. et al. Biochemical effects of deferasirox and deferasirox-loaded nanomicelles in iron-intoxicated rats // *Life Sci.* 2021. Vol. 270. P. 119146.
- 187. Timoshnikov V.A.** et al. Antioxidant Activity of Deferasirox and Its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone // *Molecules.* 2021. Vol. 26, № 16. P. 5064.
188. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. Vol. 482, № 3. P. 419–425.
189. Xia W., Budge S.M., Lumsden M.D. <sup>1</sup>H-NMR Characterization of Epoxides Derived from Polyunsaturated Fatty Acids // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2016. Vol. 93,

№ 4. P. 467–478.

190. Chatterjee S.N., Agarwal S. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation // Free Radic. Biol. Med. 1988. Vol. 4, № 1. P. 51–72.