

Окислительно-восстановительные реакции природного алкалоида лаппаконитина

Н. Э. Поляков,^{а,б*} Т. В. Лешина^а

^аИнститут химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3

^бНовосибирский государственный университет, Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2, Факс: (383) 330 7350. E-mail: polyakov@ns.kinetics.nsc.ru

Обобщены данные об окислительно-восстановительных реакциях алкалоида лаппаконитина — известного блокатора натриевых каналов. Проанализированы полученные методами ЯМР и ХПЯ данные по механизму фототрансформации лаппаконитина, в частности, о его парамагнитных формах, образующихся как при прямом фотолизе, так и при фотоиницированном взаимодействии с донорами и акцепторами электрона. Особое внимание уделено взаимодействию лаппаконитина с аминокислотами, входящими в состав активного центра натриевого канала. Рассматриваются гипотезы о возможной связи этого процесса с механизмом терапевтической активности лаппаконитина.

Ключевые слова: лаппаконитин, перенос электрона, радикалы, фоторазложение, фототоксичность, химическая поляризация ядер, супрамолекулярные комплексы, глицирризиновая кислота, аминокислоты.

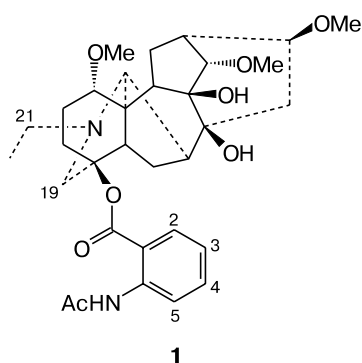
Введение

Лаппаконитин (lappaconitine, **1**) — алкалоид, выделенный из аконита (*Aconitum septentrionale* Koelle), используется в медицинской практике в качестве гипотензивного средства, а также для лечения аритмии (торговое название препарата — алапинин)^{1,2}. Интерес исследователей к фотоиницируемым превращениям биомолекул и к реакциям их парамагнитных форм обусловлен высокой реакционной способностью свободных радикалов, образующихся под действием света, и связанным с этим токсическим действием многих лекарственных препаратов³. Известно, что многие популярные гипотензивные препараты являются причиной фотодерматитов у людей, подвергающихся солнечной радиации, из-за образования парамагнитных форм этих препаратов в эпидермисе и в более глубоких слоях кожного покрова⁴. Согласно современным представлениям⁵, образовавши-

ся при взаимодействии с радикальными формами лекарственных препаратов вторичные активные кислородсодержащие свободные радикалы могут быть причиной развития многих тяжелых заболеваний, включая рак и атеросклероз, а также причиной старения организма.

Применение препарата «алапинин»¹ также ограничено его токсичностью и побочными эффектами^{2,6}, связанными в основном с его высокой фотохимической лабильностью³. Синтетические аналоги лаппаконитина — эфиры антраниловой кислоты — также используют на практике, но в качестве компонентов солнцезащитных кремов. Исследование *in vitro* соединений, входящих в состав солнцезащитных кремов, позволило обнаружить, что некоторые из них при фотолизе в различных растворителях образуют долгоживущие триплетные состояния. Захват кислорода этими триплетными состояниями приводит к генерации в растворе синглетного кислорода⁷.

Другой проблемой, актуальной как для биохимии, так и для фармакологии, является выяснение механизмов действия лекарственных препаратов на молекулярном уровне и возможности их химических превращений при взаимодействии с клеточными рецепторами. Некоторые данные указывают на возможность участия комплексов с переносом заряда в процессах лиганд-рецепторного связывания лекарств — блокаторов ионных каналов⁸. Согласно результатам расчетов⁸ при образовании комплекса активного сайта кальциевого рецептора с популярным гипотензивным препаратом — нифедипином и его структурными аналогами — происходит перенос электрона меж-



ду НОМО одной из аминокислот — тирозином и LUMO нифедипина.

Экспериментально взаимодействие нифедипина с тирозином было исследовано методом химической поляризации ядер (ХПЯ) на примере модельного фотоиницированного процесса в растворе⁹. Предполагалось, что свойства образовавшихся парамагнитных частиц в первом приближении не зависят от способа их генерации. Это исследование не только подтвердило возможность переноса электрона от тирозина к нифедипину, но и позволило получить другой важный для понимания механизма лиганд-рецепторного взаимодействия результат. Было обнаружено, что образовавшийся в результате переноса электрона анион-радикал нифедипина не стабилен и за микросекунды превращается в нитрозопиридин, который, как показало молекулярное моделирование⁹, не способен обеспечить связывание с рецептором. Таким образом, гипотеза о переносе электрона в лиганд-рецепторном комплексе позволяет объяснить не только его образование, но и диссоциацию.

Следующей системой, на которой проверяли гипотезу о возможности химического взаимодействия лекарства с аминокислотными остатками активного сайта соответствующего рецептора, был лаптаконитин (ЛК)¹⁰. Согласно данным фармакологических исследований¹¹, терапевтическое действие ЛК связывается с необратимым блокированием натриевых каналов. Известно, что ЛК связывается с сайтом 2 натриевого канала, состоящего из установленной последовательности аминокислот¹².

В результате исследования взаимодействия лаптаконитина с аминокислотами тирозином и триптофаном обнаружено образование анион-радикала лаптаконитина, который также как анион-радикал нифедипина нестабилен и превращается в соединения, не связывающиеся с данным рецептором¹⁰. Механизм реакций изучали с использованием хорошо зарекомендовавшего себя метода ХПЯ^{13–20}.

Самостоятельный интерес вызывает реакционная способность супрамолекулярных комплексов лаптаконитина с глицирризиновой кислотой (ГК) в связи со значительным усилением терапевтической активности лаптаконитина в присутствии ГК и одновременным уменьшением токсичности препарата²¹. Аналогичные эффекты были зарегистрированы и для ряда других лекарственных препаратов^{22,23}. Полагают, что это влияние связано с образованием комплексов ГК с молекулами лекарственного препарата. Однако природа влияния ГК на терапевтическое действие лекарств не известна. Обнаруженное уменьшение скорости модельных реакций, протекающих с участием комплексов²⁴, по сравнению с реакциями в гомогенном растворе, позволило выдвинуть некоторые гипотезы по поводу возможных последствий комплексообразования для процессов, протекающих в живых системах. Уменьшение реакционной способности из-за комплексообразования может сказаться на лекарственных свойствах комплексов. Во-первых, замедление скорости метаболизма ЛК в организме (либо

его связывания белками крови) приведет к увеличению эффективной концентрации ЛК в организме. Во-вторых, замедление превращения ЛК в продукт в результате взаимодействия с активным центром клеточных рецепторов приведет к увеличению эффективного времени удерживания лекарства на рецепторе. Оба эти процесса могут в принципе привести к усилению терапевтического действия лекарства. Альтернативным объяснением наблюдаемого терапевтического эффекта могло бы быть наличие некоего специфического взаимодействия между активным центром рецептора и комплексом. Подобное связывание также могло бы привести к увеличению времени удерживания препарата на рецепторе, но только в том случае, если это связывание обратимо и диссоциация лиганд-рецепторного комплекса не лимитируется его химическим превращением на рецепторе. С этой точки зрения важно отметить, что терапевтическое действие ЛК связывается с необратимым блокированием натриевых каналов¹¹.

1. Фоторазложение алкалоида лаптаконитина и других эфиров антралиновой кислоты в растворах

При обсуждении возможных направлений фототрансформации ЛК следует принять во внимание, что молекула лаптаконитина бифункциональна. С одной стороны, наличие амидной и эфирной карбонильных групп в ароматическом кольце (антралиновый фрагмент) придает ему электронно-акцепторные свойства. С другой стороны, атом азота N(20), жестко связанный с эфирным атомом кислорода через углеводородный мостик, обеспечивает электронно-донорные свойства ЛК. По этой причине в фотоиницируемых процессах можно ожидать внутри- или межмолекулярного переноса электрона с аминогруппы именно на этот фрагмент. В литературе имеются примеры внутримолекулярного переноса электрона в подобных системах^{25,26}. Авторы этих работ наблюдали образование жестко связанной промежуточной ион-радикальной пары, а также 1,4-бирадикала при фотоллизе диалкиламинокетонов и эфиров ацилбензоата. В обоих случаях наличие аминного азота в молекуле приводило к быстрому тушению возбужденного триплетного состояния с константой скорости порядка $5 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$. В случае γ -аминокетона образование бирадикала происходило в результате переноса атома водорода от ближайшей к азоту CH_2 -группы к карбонильной группе кетона. Конечным продуктом реакции являлся соответствующий ацетофенон, образующийся при распаде бирадикала²⁵. Отметим, однако, что авторы предполагали образование бирадикала напрямую из возбужденного триплетного состояния исходной молекулы, параллельно с образованием комплекса с переносом заряда. В то же время, применение методик с высоким временным разрешением (ЭПР, ХПЯ) позволяет сделать вывод, что взаимодействие третичных аминов с карбонильными соединениями в триплетно-возбужденном состоянии идет через последовательный перенос электрона и протона^{27,28}.

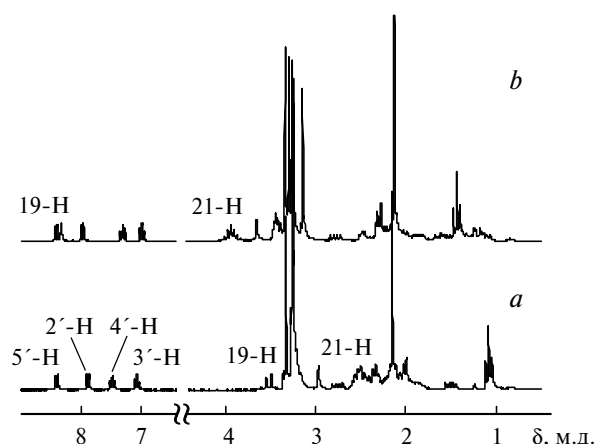


Рис. 1. Спектры ^1H ЯМР (200 МГц) лапаконитина до (а) и после (б) фотолиза в CD_3OD .³⁰

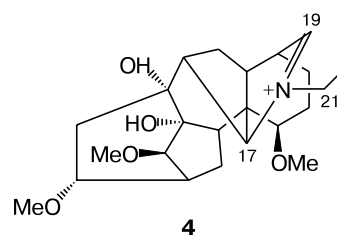
Измеренные в этих работах скорости депротонирования катион-радикала амина составляют 10^8 – 10^{10} моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$ для сред различной полярности и кислотности.

Мы предположили, что фотолиз лапаконитина может протекать по аналогичному механизму, однако эффективность реакции в этом случае может быть существенно снижена из-за наличия стерических затруднений вследствие жесткости молекулы ЛК. И, конечно, возможен путь альтернативный внутримолекулярному переносу электрона — деацилирование с выбросом ацильного радикала. Именно деацилированная форма ЛК является его основным метаболитом в организме²⁹, поэтому выяснение возможности осуществления процесса деацилирования при фотолизе представляет определенный практический интерес, принимая во внимание лечебные свойства ЛК.

1.1. Анализ эффектов ХПЯ и продуктов фотолиза в нейтральных средах. В спектре ЯМР ^1H , зарегистрированном

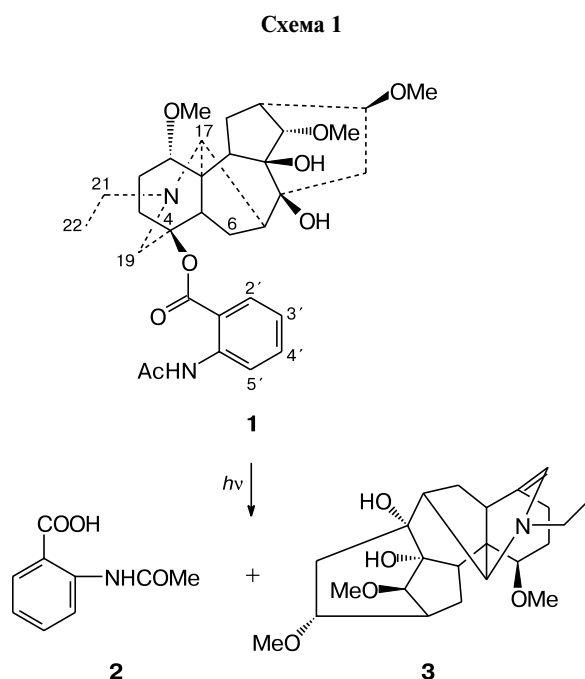
после фотолиза, наблюдали только один продукт, содержащий ароматические протоны (рис. 1). Положение линий ароматических протонов этого продукта совпадает с сигналами в спектре ЯМР ^1H *N*-ацетилантраниловой кислоты (2)¹⁰. Анализ спектров ЯМР ^1H и масс-спектрометрический анализ позволили сделать вывод о строении продуктов фотолиза (схема 1)³⁰.

Однако наблюдаемые химические сдвиги в спектре ЯМР ^1H продуктов фотолиза не характерны для соединения 3. Было предположено, что в присутствии *N*-ацетилантраниловой кислоты это соединение может протонироваться с образованием катиона имина 4.

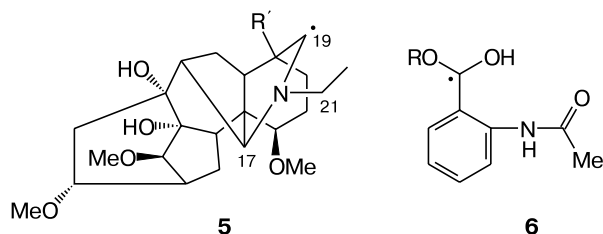


Для изучения механизма реакции мы использовали метод ХПЯ с временным разрешением³⁰. Сам факт наблюдения поляризации указывает на образование поляризованных продуктов по радикальному механизму, а спектр ХПЯ содержит информацию о структуре промежуточных парамагнитных интермедиатов, участвующих в реакции^{13–21}. Это делает метод ХПЯ мощным инструментом для изучения механизмов радикальных реакций.

Эффекты химической поляризации ядер в исследуемой реакции наблюдали только в полярных растворителях: метаноле, ацетонитриле. Спектр ХПЯ, зарегистрированный при фотолизе ЛК в метаноле (рис. 2), демонстрирует как поляризацию протонов групп $\text{N}-\text{CH}_2$ исходного ЛК: адсорбцию на протонах 21-Н (два протона — 2.5 м.д.) и 19-Н (один протон — 2.5 м.д., один протон — 3.5 м.д.), так и поляризацию на соответствующих протонах продукта 4: адсорбцию на протоне 19-Н (один протон — 8.3 м.д.) и эмиссию на протоне 21-Н (два протона — 3.9 м.д.). Кроме того, наблюдается поляризация на протонах воды (4.8 м.д.). Описанные эффекты ХПЯ указывают на то, что первым актом фотолиза является перенос электрона. Наличие поляризации на CH_2 -группах этильных фрагментов ЛК и 4 при ее полном отсутствии на Me -группе характерно для катион-радикалов аминов и отражает распределение констант СТВ в этих парамагнитных частицах (например, для триэтиламина $A(\text{CH}_2) \approx 3$ мТл, $A(\text{CH}_3) \approx 0$)²⁸. Кроме того, на формирование ХПЯ в акте переноса электрона указывает и проявление ХПЯ только в полярных растворителях. Опираясь на упомянутые данные о фотофизических свойствах ЛК, а также обнаруженные эффекты ХПЯ, было предположено, что положительный заряд локализован на атоме азота N(20), тогда как отрицательный располагается на антраниловом фрагменте (схема 2)³⁰.



сия. Наиболее вероятной причиной этого расхождения может быть формирование эффектов ХПЯ этих протонов в различных РП. Наблюдаемое различие знаков ХПЯ Н-19 и Н-21 хорошо укладывается в гипотезу об образовании последовательной нейтральной пары радикалов **5** и **6**, в результате переноса протона из положения 19 катион-радикала на карбоксильный атом кислорода анион-радикала ЛК.

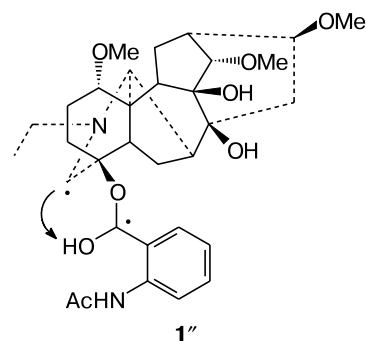


Действительно, в радикале **5** наибольшая константа сверхтонкого взаимодействия (СТВ) будет на α -протонах 19-Н ($A \approx -2.3$ мТл) и ее знак должен быть отрицательным. На γ -протонах (17-Н и 21-Н) по аналогии с нейтральным радикалом триэтиламина можно ожидать $A \approx 0.4$ мТл, $g \approx 2.0033$ (см. лит.²⁸). Таким образом, наблюдаемая поляризация протонов **4** отвечает суперпозиции эффектов ХПЯ, сформированных в ИРП и в паре нейтральных радикалов, при этом для протонов Н-21 и Н-17 преобладающим будет вклад из ИРП, тогда как для Н-19 — это вклад нейтральной РП.

Существование двух источников ХПЯ протонов в положениях 19 и 21 находит отражение и в ходе временных зависимостей ХПЯ: скорость накопления поляризации отличаются более чем вдвое для этих протонов, причем ход временных зависимостей совпадает для Н-21 и протонов воды. Последнее наблюдение указывает на происхождение поляризации этих протонов из одного источника (ИРП 2). Действительно, наиболее естественным источником появления поляризации на воде представляется обмен протонов воды с карбоксильной группой *N*-ацетилантралиновой кислоты. Образование поляризованной карбоксильной группы может произойти только в результате постулируемого выше переноса протона от

19-СН₂-группы катион-радикала на эфирный фрагмент анион-радикала. Радикал **6** подвергается фрагментации с образованием *N*-ацетилантралиновой кислоты¹⁰. Константа скорости реакции фрагментации этого радикала, $k_{fr} = 4 \cdot 10^5$ с⁻¹. Таким образом, наличие поляризации на молекуле воды является одним из доказательств предлагаемой схемы фотолиза ЛК (схема 4).

Образование поляризованного продукта **4** возможно только в результате фрагментации радикала **5** за время меньше времени спин-решеточной релаксации в радикале ($T_1 \approx 10^{-5}$ с). Отметим, что те же продукты могут образовываться и при распаде нейтрального бирадикала **1''**, однако, согласно существующим представлениям¹³, трудно ожидать, что в коротком 1,4-бис-радикале в наших экспериментальных условиях (магнитное поле ЯМР-спектрометра) будет формироваться химическая поляризация ядер.

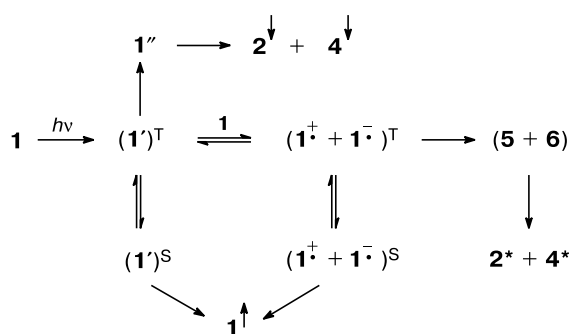


Таким образом, в полярных средах первой стадией процесса является внутримолекулярный перенос электрона в триплетно-возбужденном состоянии ЛК с атома азота N(20) на антралиновый фрагмент с образованием бирадикала **1'**. Последующая перезарядка этого бирадикала с молекулой лаптаконитина в объеме приводит к образованию ион-радикальной пары ИРП2, в которой происходит перенос протона, с образованием нейтральной радикальной пары. Конечными продуктами реакции являются *N*-ацетилантралиновая кислота **2** и соединение **3**, образующиеся в результате фрагментации нейтральных радикалов.

1.2. Механизм реакции в кислых средах. Дополнительное подтверждение сделанных выводов о механизме реакции было получено нами путем сравнения эффектов ХПЯ в нейтральной и кислой среде. Идея состояла в уменьшении донорной способности аминной группы путем протонирования атома азота в кислой среде. Как и ожидалось, значительно уменьшилась поляризация на продуктах, образованных из первичной ИРП и нейтральной радикальной пары (рис. 4, линии при 8.3 и 3.9 м.д.). Кроме того, появилась поляризация на лаптаконитине и его дезацелированной форме **8** (схема 5). Сигналы при 6.4—6.6 м.д. соответствуют протонам 3'-Н и 5'-Н дезацелированной формы ЛК.

Как уже было сказано, интенсивность ХПЯ на продукте пропорциональна константе сверхтонкого взаимодействия на радикале-предшественнике. Более

Схема 4



Примечание: знаками «↑» и «↓» обозначены «клеточная» и «внеклеточная» поляризация, формирующаяся в ИРП, а знаком «*» поляризация из нейтральной радикальной пары.

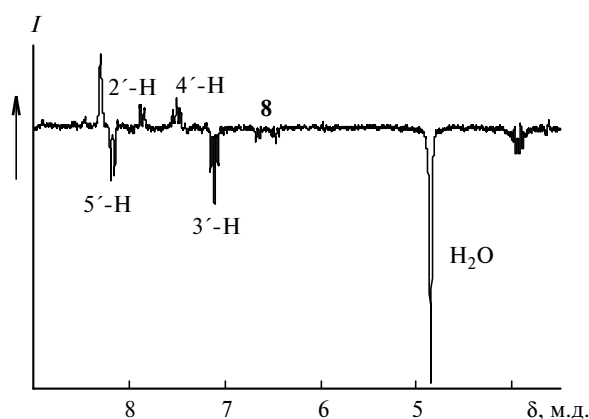


Рис. 4. Спектр ХПЯ, зарегистрированный после лазерного облучения ЛК (10 ммоль) в CD_3OD в кислой среде (в присутствии 0.2 моля уксусной кислоты)³⁰.

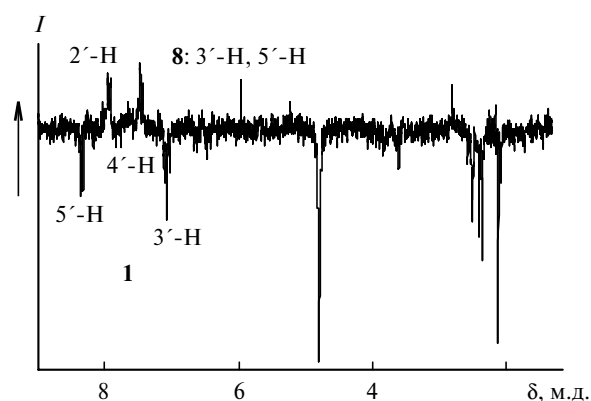
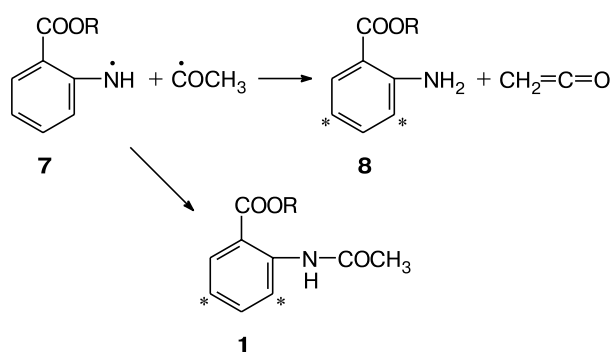


Рис. 5. Спектр ХПЯ, зарегистрированный после лазерного облучения метильного эфира *N*-ацетилантраниловой кислоты (10 ммоль) в CD_3OD .

Схема 5



Знаком «*» обозначены ароматические протоны, на которых наблюдается максимальная поляризация.

сильная поляризация на протонах 3'-H, 5'-H по сравнению с протонами 2'-H, 4'-H позволяет сделать предварительные выводы о структуре радикала — предшественника поляризованного продукта. Наиболее вероятной структурой представляется *N*-центрированный радикал 7. Он может образоваться в мономолекулярной реакции распада возбужденного состояния ЛК с образованием ацильного радикала в качестве партнера (см. схему 5). Протоны NH- и NH₂-групп не наблюдаются в данных экспериментальных условиях вследствие быстрого обмена с водой. При этом вся поляризация с этих групп переходит на протоны воды, что и наблюдается в эксперименте (эмиссия при 4.8 м.д.).

1.3. Фотолиз других эфиров *N*-ацетил-антраниловой кислоты. Логично предположить, что дезацилирование будет основным каналом фотолиза более простых алифатических эфиров антраниловой кислоты, у которых отсутствует донорная группировка. Эта гипотеза была проверена на примере фотолиза метилового эфира *N*-ацетилантраниловой кислоты³³. Спектр ХПЯ в данном случае аналогичен спектру для случая фотолиза ЛК в кислой среде. Максимальная поляризация наблюдалась на 3'- и 5'-протонах исходного эфира и его дезацилированной формы 8 (рис. 5). По-

ляризованные линии в районе 2—2.5 м.д. принадлежат продуктам реакции ацильного радикала в растворе. Наличие свободного ацильного радикала в растворе согласуется с гипотезой об образовании РП ацильного и *N*-центрированного радикалов.

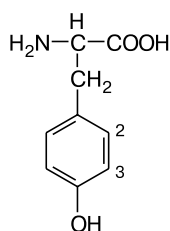
Отметим, что квантовый выход образования дезацилированного продукта существенно (более чем на порядок) меньше, чем выход продуктов 2 и 3 при фотолизе ЛК.

Таким образом, суммируя результаты, можно сделать вывод о существовании двух путей фототрансформации ЛК, идущих из триплетно-возбужденного состояния: 1) внутримолекулярный перенос электрона с атома азота N(20) на антраниловый фрагмент с дальнейшей перезарядкой с образованием разделенной ИРП и переносом протона с образованием нейтральной радикальной пары; конечными продуктами реакции фрагментации являются *N*-ацетилантраниловая кислота и соединение 4; 2) дезацилирование с разрывом связи C—N в антраниловом фрагменте и образованием нейтральной РП; конечным продуктом этой реакции является *N*-дезацетиллапаконитин. В нейтральной среде второй путь является минорным для ЛК, однако он является основным для алифатических эфиров *N*-ацетилантраниловой кислоты, не содержащих донорных фрагментов в алифатической части. В кислой среде, в результате протонирования атома азота N(20) лапаконитина или при его химической модификации (например, для его лечебной формы — гидробромида) вероятность дезацилирования ЛК существенно возрастает.

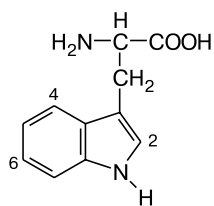
Подчеркнем, что высокая фоточувствительность лапаконитина по сравнению с другими эфирами антраниловой кислоты связана с именно наличием электронодонорной группы N(20), что создает предпосылки для внутримолекулярного переноса электрона. В результате поглощения света молекулой ЛК происходит образование как ион-радикалов, так и нейтральных свободных радикалов (углерод-, азот- и кислородцентрированных). Это может являться причиной высокой фототоксичности лапаконитина.

2. Перенос электрона в реакции лаппаконитина с аминокислотами

Нам не удалось обнаружить в литературе работ, посвященных реакциям ЛК с аминокислотами, хотя реакции переноса электрона между тирозином, триптофаном и некоторыми биологически значимыми молекулами уже изучали ранее с использованием методов ХПЯ и лазерного флеш-фотолиза^{34,35}. В этих работах было найдено, что указанные аминокислоты способны выступать в качестве доноров электрона и протона при наличии подходящего акцептора в растворе. Были охарактеризованы магнитно-резонансные параметры катион-радикалов и нейтральных радикалов тирозина и триптофана^{34,35}.



Тирозин



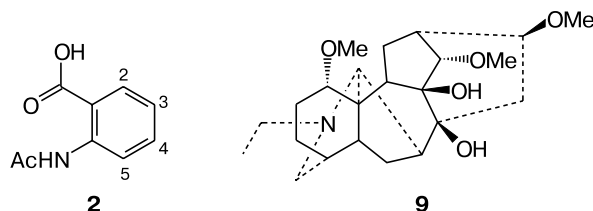
Триптофан

Для изучения взаимодействия ЛК с этими аминокислотами мы использовали метод ХПЯ с фотогенерацией¹⁰. Это сделано в рамках разработанной ранее методики, основанной на использовании модельных процессов для исследования механизмов взаимодействия лекарственных препаратов с клеточными рецепторами⁹. В рамках этого подхода использовали фотоинициацию процесса переноса электрона, а дальнейшая судьба радикальных частиц прослеживалась с помощью метода ХПЯ. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения возможного влияния трансформаций ЛК на лиганд-рецепторное связывание.

2.1. Анализ продуктов реакции. При обсуждении возможных направлений трансформации ЛК в результате фотоиницированного взаимодействия с донорами электрона следует принять во внимание, что молекула лаппаконитина представляет собой сложный ароматический эфир, обладающий электронно-акцепторными свойствами³⁶. Для фотолиза ароматических сложных эфиров в присутствии доноров электрона характерен разрыв эфирной связи С—О с образованием соответствующей кислоты³⁶. Известно, что фотофизические свойства ЛК полностью определяются антраниловым фрагментом^{37,38}, поэтому в фотоиницируемых процессах можно ожидать переноса электрона с аминокислот именно на этот фрагмент. Как уже говорилось, наличие амидогруппы не позволяет исключить и альтернативный путь реакции — деацилирование. Это предположение подкрепляет тот факт, что деацилированная форма ЛК является его основным метаболитом в организме²⁹.

Полученные результаты¹⁰ позволили сделать однозначный выбор между этими механизмами и идентифицировать продукты реакции. Анализ спектров

ЯМР продуктов фотолиза ЛК в полярных растворителях (ацетонитриле, метаноле, воде) в присутствии аминокислот, а также хроматографический анализ продуктов указывают на образование *N*-ацетилантраниловой кислоты (**2**) и соединения **9** и на отсутствие каких-либо признаков деацилированного продукта.



2.2. Анализ эффектов ХПЯ. При фотоиницированном взаимодействии ЛК с *N*-ацетилтирозином (АсТур) и *N*-ацетилтриптофаном (АсТрп) были зарегистрированы эффекты химической поляризации ядер, как на исходных соединениях, так и на продукте **1** (см. лит.¹⁰). Важно отметить, что, хотя свет в обоих случаях поглощается преимущественно лаппаконитином, реакция с аминокислотами проходит более эффективно, чем собственный фотолиз. В спектре ХПЯ это проявляется в существенном уменьшении (вплоть до полного исчезновения при больших концентрациях аминокислот) сигналов ХПЯ продуктов саморазложения ЛК.

Наблюдание эффектов ХПЯ однозначно указывает на участие парамагнитных частиц в реакции¹³. Для установления строения этих частиц знаки поляризованных линий и их интенсивности сопоставляются с магнитно-резонансными параметрами (константы сверхтонкого взаимодействия и *g*-факторы) предполагаемых парамагнитных предшественников продуктов^{14–20}. Прежде всего следует отметить, что при фотоиницированном взаимодействии ЛК с аминокислотами эффекты ХПЯ были зарегистрированы только в полярных средах: ацетонитриле, диметилсульфоксиде, метаноле и воде¹⁰. Наличие ХПЯ в полярных растворителях, при отсутствии поляризации в неполярной среде (в нашем случае это — бензол) является одним из тестов на перенос электрона как первичную стадию процесса¹³.

В качестве примера на рисунке 6 приведен спектр ХПЯ, зарегистрированный при фотолизе ЛК в присутствии *N*-ацетилтриптофана в водно-метанольном растворе. Приведенный на рисунке 6 спектр ХПЯ демонстрирует наличие поляризации на ароматических и амидных протонах лаппаконитина и *N*-ацетилантраниловой кислоты, а также на протонах молекулы воды. Анализ знаков и интенсивностей поляризованных линий по существующим правилам¹³, с учетом магнитно-резонансных параметров предполагаемых парамагнитных частиц^{31,39}, позволил сделать вывод об образовании ион-радикальной пары, состоящей из анион-радикала ЛК и катион-радикала АсТрп в этой реакции. При этом лаппаконитин вступает в реакцию в триплетно-возбужденном состоянии. Противоположный знак поляризации ЛК и *N*-ацетилан-

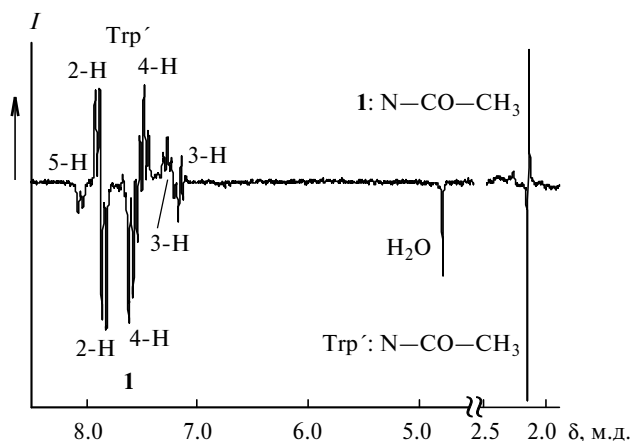
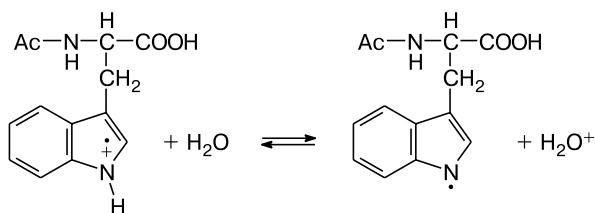


Рис. 6. Спектр ХПЯ ^1H , зарегистрированный после облучения лаптаконитина (3 ммоль) светом лазера ($\lambda = 308$ нм) в присутствии аминокислоты *N*-ацетилтриптофана (Трп) (10 ммоль) в водно-метанольном растворе¹⁰.

раниловой кислоты указывает на образование последней в результате фрагментации анион-радикала ЛК в растворе. Следует отдельно остановиться на обсуждении поляризации протонов воды, зарегистрированной в экспериментах с *N*-ацетилтриптофаном¹⁰ (см. рис. 6). Наиболее естественным ее источником представляется депротонирование катион-радикала АсТрп в объеме, протекающее по схеме 6. Литературные данные указывают, что скорость депротонирования катион-радикала *N*-ацетилтриптофана в водных растворах составляет около 10^6 с⁻¹, что существенно превышает скорости спин-решеточной релаксации в радикалах³¹. Этот факт — еще одно свидетельство в пользу образования ИРП, поскольку поляризация на NH-группе не может сформироваться в нейтральной радикальной паре, т.к. в нейтральном радикале *N*-ацетилтриптофана этот протон отсутствует.

Схема 6



Анализ временной эволюции сигналов ХПЯ продуктов реакции (рис. 7) указывает на высокие скорости трансформации анион-радикала лаптаконитина в *N*-ацетилантралиловую кислоту (2). Кроме того, падение интенсивности ХПЯ лаптаконитина отражает вклад электронного обмена анион-радикала ЛК со своим диамагнитным предшественником, сопоставимого по скорости со скоростью его протонирования, приводящего к образованию 2 ($k_e \approx 1.5 \cdot 10^8$ моль⁻¹ · с⁻¹). *N*-Ацетилтриптофан, судя по временной зависимости, участвует в более медленной реакции протонного обмена с нейтральным радикалом ($k_p \approx 10^7$ моль⁻¹ · с⁻¹).

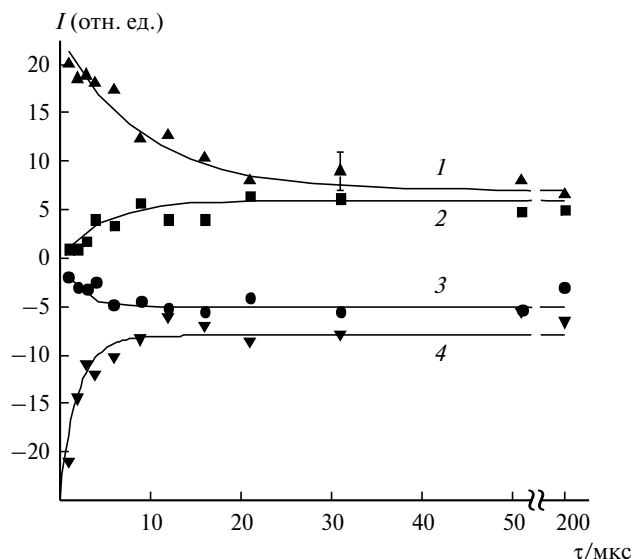
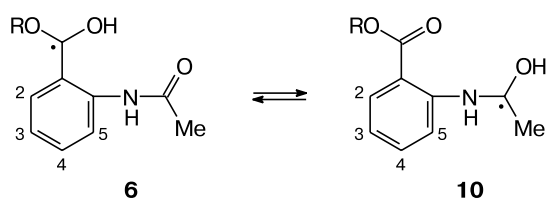


Рис. 7. Зависимость интегральной интенсивности ХПЯ (I) ароматических протонов *N*-ацетилтриптофана (1), *N*-ацетилантралиловой кислоты (2), H_2O (3) и лаптаконитина (1) (4) от временной задержки между импульсом лазера и регистрирующим импульсом $P1 = 1$ мкс (см. лит.¹⁰).

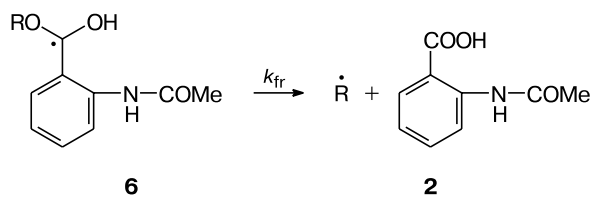
Аналогичные эффекты были зарегистрированы и при фотолизе ЛК в присутствии *N*-ацетилтирозина¹⁰. Эффекты ХПЯ на протонах воды, детектированные в экспериментах с АсТрп, в случае АсТуг отсутствует. Отсутствие поляризованной воды может быть связано как с известным фактом, что катион-радикал АсТуг теряет протон еще при временах, характерных для геминальных процессов, так и с отсутствием функциональных групп с заметными константами СТВ, способных обмениваться с водой³². Действительно, эффекты ХПЯ *N*-ацетилтирозина соответствуют распределению спиновой плотности в свободном радикале, а не в ион-радикале, как было в случае *N*-ацетилтриптофана, поскольку наблюдаемое отношение интенсивностей ХПЯ для *орто*- и *мета*-протонов равно 3.5, вместо 7.0, ожидаемого для катион-радикала^{10,32}. Необходимо отметить, что зафиксированные ранее в литературе эффекты ХПЯ в окислительно-восстановительных фото процессах с участием тирозина также приписывались паре нейтральных радикалов тирозина и субстрата³⁴. Можно предположить, что нейтральный радикал АсТуг образовался вследствие быстрого депротонирования катион-радикала с уходом протона в среду. Анализ временной зависимости ЛК (быстрый выход на плато) указывает также на ускорение протонирования анион-радикала ЛК в объеме в присутствии АсТуг, по сравнению с реакцией с АсТрп. Это согласуется с различием величин rK_a для депротонирования *N*-ацетилтриптофана (4.7)³¹ и *N*-ацетилтирозина (2.2)⁴⁰. Наличие поляризации на метильных протонах амидогрупп ЛК и 2, которая не могла бы сформироваться в ион-радикале ЛК, указывает, что в анион-радикале ЛК возможно протонирование по обеим карбонильным группам: эфирной и амидной, и между этими структурами происходит быстрый обмен (схема 7)¹⁰.

Схема 7



В пользу того, что поляризация Ме-протонов действительно является результатом процессов, протекающих в объеме, свидетельствует ее уменьшение с ростом pH среды вплоть до полного исчезновения при pH 14. Из временной зависимости эффектов ХПЯ соединения **2** была сделана оценка константы скорости распада k_{fr} радикала **6** (схема 8), образовавшегося в результате протонирования анион-радикала ЛК. Оценка сделана в рамках предположений, что в кинетику роста поляризации на внеклеточном продукте вносят вклад три процесса: фрагментация поляризованного радикала **6** с образованием **2**, релаксация ХПЯ в этом радикале, и, наконец, гибель поляризованного радикала в других процессах не связанных с фрагментацией. Однако, учитывая, что интенсивность поляризации ароматических протонов *N*-ацетилантралиновой кислоты почти совпадает с таковой в ЛК, можно сделать вывод, что скорость фрагментации превышает скорости всех остальных указанных процессов и для оценки константы скорости реакции фрагментации можно воспользоваться одноэкспоненциальным приближением. Полученная таким образом константа скорости фрагментации радикала **6** $k_{fr} \approx 4 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$.

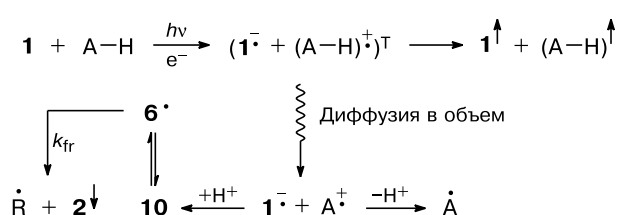
Схема 8



2.3. Механизм реакции. Таким образом, исходя из анализа эффектов ХПЯ и состава продуктов, был сделан вывод, что механизм фотоиницированного взаимодействия ЛК с аминокислотами близок к описанному³⁶ в литературе механизму фотолиза сложных эфиров, для которых характерен разрыв эфирной связи C(O)O—R с образованием соответствующей кислоты. Различие фотоиницируемых реакций ЛК с *N*-ацетилтирозином и *N*-ацетилтриптофаном сводится только к различию в строении парамагнитных частиц аминокислот. Поскольку в реакциях ЛК с этими аминокислотами получаются одни и те же продукты, нами предположен общий механизм для трансформации ЛК в присутствии АсТуг и АсТгр (схема 9).

Таким образом, анализ эффектов ХПЯ и состава продуктов позволил предложить трехстадийный механизм фотоиницированного взаимодействия ЛК с

Схема 9



Примечание: А—Н — аминокислота Туг или Тгр, А — депротонированная форма аминокислот; знаками «↑» и «↓» отмечены поляризованные продукты, образовавшиеся в результате клеточной рекомбинации и внеклеточных процессов соответственно.

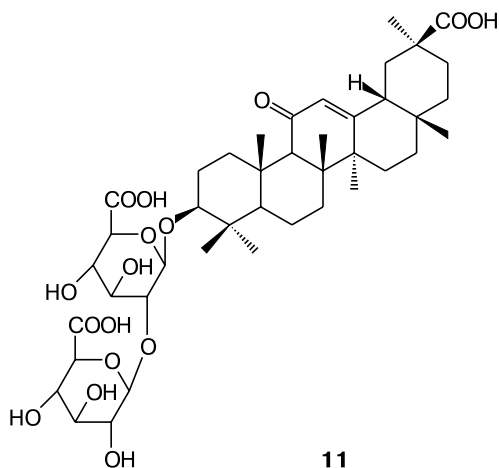
аминокислотами. Первой стадией процесса является перенос электрона с аминокислоты на антралиновый фрагмент ЛК. Вторая стадия — протонирование анион-радикала ЛК, происходящая в объеме с образованием нейтрального радикала с двумя взаимно превращающимися структурами. И третья стадия — фрагментация нейтрального радикала **6**, приводящая к конечному продукту **1** и радикалу **R**. Образование диамагнитного продукта **9** может происходить путем отрыва атома водорода радикалом **R** от растворителя.

2.4. Биологическая значимость результата. Таким образом, в результате переноса электрона с аминокислот АсТуг и АсТгр на лаппаконитин образуется анион-радикал ЛК, который подвергается быстрому распаду с образованием соединений **2** и **3**. Резонно предположить, что эти соединения, не являющиеся лекарственными препаратами, уже не будут и блокаторами натриевых каналов. В результате этого лиганд-рецепторное связывание алапинина с сайтом 2 натриевого канала может нарушаться. Ранее⁹, в работе, посвященной моделированию взаимодействия другого лекарственного препарата — нифедипина с кальциевым рецептором, была также обнаружена нестабильность анион-радикала, получившегося в результате переноса электрона с тирозина на нифедипин. Было продемонстрировано, что образовавшийся продукт уже не связывается с рецептором. Таким образом, эти два примера, позволяют представить возможную роль простейшей химической реакции — переноса электрона — в процессах лиганд-рецепторного взаимодействия. Химическое превращение лекарства может обеспечивать обратимость процесса связывания препарата с рецептором.

3. Реакционная способность лаппаконитина в комплексе с глицирризиновой кислотой

Основной причиной интереса физико-химиков к исследованию влияния глицирризиновой кислоты (ГК, **11**) на свойства лаппаконитина явилось экспериментальное обнаружение существенного изменения его терапевтической активности в присутствии ГК.

Было обнаружено²¹, что добавление ГК в раствор лаппаконитина позволяет на порядок снизить тера-



певтическую дозу и уменьшить побочное токсическое действие препарата. Поскольку в цитируемых публикациях не было предложено объяснения наблюдаемым эффектам, нами было проведено исследование комплексообразования ЛК с ГК, а также возможности воздействия этого процесса на реакционную способность ЛК в модельных процессах. В результате исследований был подтвержден факт комплексообразования лаппаконитина с ГК и предложена гипотеза, описывающая, каким образом ГК может влиять на реакционную способность ЛК в актах взаимодействия с аминокислотами, входящими в активный центр рецепторов натриевого канала²⁴. Подробно эта реакция описана выше (см. параграф 2 настоящего обзора).

3.1. Исследование стабильности комплекса. На рисунке 8 приведен пример оценки константы стабильности комплекса лаппаконитина с ГК по изменению оптического спектра раствора ЛК в зависимости от концентрации глицирризиновой кислоты. Константа стабильности комплекса K представляет собой отношение скоростей прямой и обратной реакции, и для комплекса состава 1 : 1 она равна отношению кон-

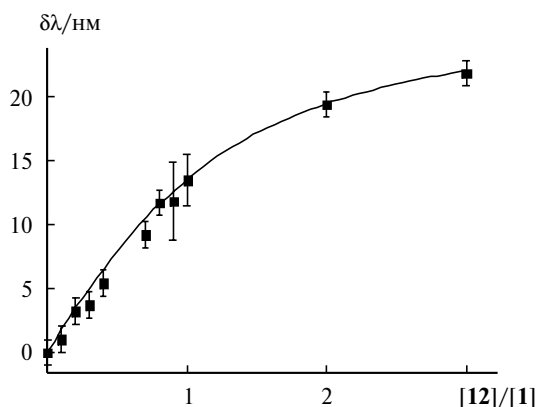
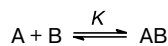


Рис. 8. Экспериментальная зависимость и компьютерное моделирование сдвига максимума поглощения ЛК от концентрации глицирризиновой кислоты. Измерения проводили в 20%-ном водно-метанольном растворе при концентрации ЛК $0.01 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (см. лит.²⁴). $K = 2 \cdot 10^5 \pm 0.13 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}$.

центрации комплекса к произведению концентраций исходных соединений.



$$K = k_+/k^- = [AB]/([A][B])$$

Компьютерное моделирование²⁴ кривой приведенной на рисунке 8 позволило оценить константу стабильности комплекса в водной среде, $K = (2.0 \pm 0.13) \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}$. Заключение о стехиометрии комплекса было сделано на основании анализа диаграммы Джоба^{41,42}. Полученная величина указывает на чрезвычайную устойчивость комплекса. Для сравнения следует отметить, что константы стабильности широко используемых в фармакологии комплексов циклодекстринов^{41,43} составляют в среднем 10^3 моль^{-1} . Высокие значения констант стабильности были получены и рядом авторов для комплексов ГК с несколькими другими лекарственными препаратами^{22,44}. Это делает глицирризиновую кислоту весьма перспективным объектом для фармакологии, поскольку позволяет рассчитывать на комплексообразование при использовании малых концентраций лекарственных препаратов. Можно предположить, что причина столь высокой стабильности комплексов ГК связана с плохой растворимостью в воде как ГК, так и ЛК. Гидрофобное взаимодействие может стимулировать образование супрамолекулярных ассоциатов сложной структуры.

Для выяснения влияния растворителя на стабильность комплексов глицирризиновой кислоты в растворе были измерены константы стабильности указанного комплекса в чистом метаноле и водном растворе ДМСО²⁴. Было показано, что в 20%-ном водном растворе ДМСО комплекс столь же стабилен, как и в 20%-ном метанольном растворе. В то же время, в чистом метаноле константа стабильности уменьшилась на порядок.

В фармакологической практике используют не сам ЛК из-за его плохой растворимости в воде, а его гидробромид. С точки зрения практического применения комплексов в фармакологии важно было выяснить, обладает ли комплекс гидробромида столь же высокой стабильностью, как комплекс исходного ЛК. Полученная константа стабильности для комплекса лаппаконитина гидробромида ($K = 2.6 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1}$) на два порядка меньше соответствующей величины для самого ЛК. Мы полагаем, что это связано с хорошей растворимостью соли в воде. Таким образом, обнаруженное влияние растворителя на стабильность комплекса и уменьшение стабильности для водорастворимой соли лаппаконитина указывает на существенную роль гидрофобного взаимодействия в комплексообразующей способности ГК.

3.2. Фотоиницированное взаимодействие ЛК с тирозином в комплексе. Для выяснения влияния ГК на реакционную способность лаппаконитина в качестве модельной реакции была изучена реакция фотопереноса электрона между лаппаконитином и тирози-

ном — аминокислотой, входящей в активный центр натриевого канала.

Влияние комплексообразования на реакционную способность ЛК оценивали как по интенсивности эффектов ХПЯ, отражающих количество образующихся в реакции радикальных пар, так и по выходу продуктов реакции с тирозином. Для сравнения на рисунке 9 представлены спектры ЯМР конечных продуктов фотолитиза, а также спектры ХПЯ в присутствии и в отсутствие ГК. В спектре ХПЯ видны поляризованные линии как исходных соединений, ЛК и ГК, так и продукта — *N*-ацетилантралиновой кислоты. Две дополнительные линии при 8.1 и 8.3 м.д., наблюдаемые в отсутствие глицирризиновой кислоты, принадлежат продукту саморазложения лаппаконитина. При используемых концентрациях реагентов процесс внутримолекулярного переноса электрона идет параллельно межмолекулярной реакции с аминокислотами и приводит к образованию другого набора продуктов²⁴.

Первый вывод, который можно сделать из сравнения спектров ХПЯ (см. рис. 9, спектры 4 и 5), состоит в том, что присутствие ГК практически полностью блокирует радикальный путь реакции. Эксперименты показали, что этот эффект не связан с изменением кислотности среды. Существенно (в ~4 раза) умень-

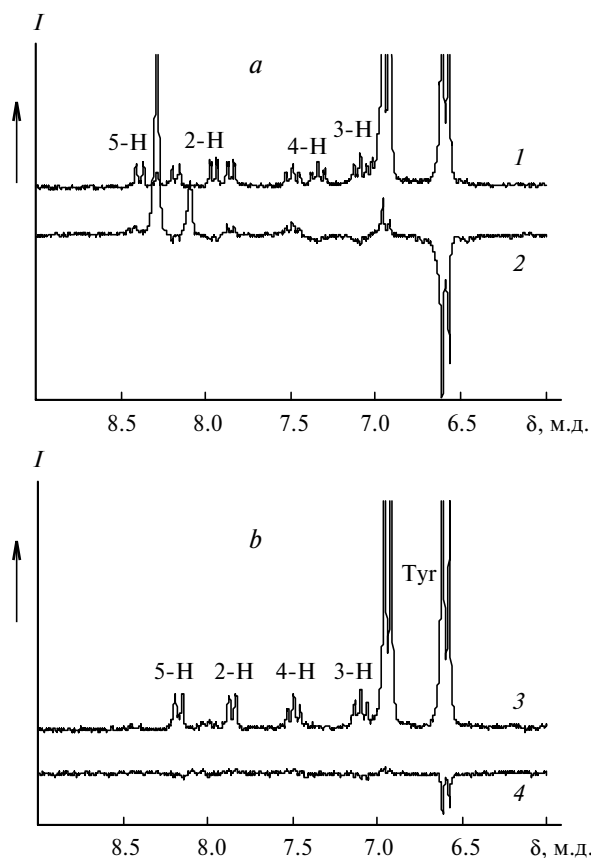


Рис 9. Спектры ЯМР ^1H (200 МГц) продуктов фотолитиза в отсутствие (1) и в присутствии ГК (3).²⁴ Спектры ХПЯ (ароматическая часть), зарегистрированные после лазерного облучения лаппаконитина (3 ммоль \cdot л $^{-1}$) в присутствии аминокислоты *N*-ацетилтирозина в CD_3OD в отсутствие (2) и в присутствии (4) глицирризиновой кислоты.

шается и интенсивность поляризации на тирозине, и во столько же раз — выход продукта реакции — антралиновой кислоты (ср. спектры 1 и 3). Таким образом, присутствие ГК приводит к существенному снижению скорости фотопревращения ЛК. Рассуждая о механизме влияния комплексообразования на реакционную способность лаппаконитина, помимо очевидной причины — возникновения стерических затруднений для бимолекулярных реакций — можно сослаться на результаты исследования комплексов ГК с каротиноидами^{42,45}. Показано⁴⁴, что причиной существенного замедления скорости переноса электрона в реакциях с различными акцепторами является влияние комплексообразования на потенциалы окисления каротиноидов. Этот результат может иметь большое практическое значение для понимания механизма влияния ГК на терапевтическую активность лекарственных препаратов.

В заключение отметим, что алкалоид лаппаконитин в окислительно-восстановительных процессах может проявлять как электронодонорные, так и акцепторные свойства. В присутствии доноров электрона лаппаконитин образует анион-радикалы, а в присутствии акцепторов электрона — катион-радикалы. Кроме того, в триплетном возбужденном состоянии лаппаконитин подвергается внутримолекулярному переносу электрона с образованием бирадикала. Важным моментом является нестабильность ион-радикалов лаппаконитина. В растворе они быстро протонируются/депротонируются с образованием нейтральных радикалов. Те, в свою очередь, подвергаются фрагментации по эфирной связи С—О с образованием *N*-ацетилантралиновой кислоты. Деацилирование лаппаконитина в нейтральной среде является минорным процессом, однако может играть заметную роль в кислой среде. Комплексообразование с глицирризиновой кислотой существенно снижает скорость разложения лаппаконитина и выход свободных радикалов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 04-03-32449), Российской академии наук (интеграционный проект СО РАН № 146 «Научные основы создания лекарственных препаратов. Перспективы использования биологического сырья», программа Президиума РАН № 18.2 «Происхождение и эволюция биосферы») и Министерства образования и науки РФ (программа «Развитие научного потенциала высшей школы», РНП 2.1.1.1969).

Список литературы

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Торсинг, Харьков, 1998, 1, 380.
2. Ф. Н. Джахангиров, М. Н. Султанходжаев, Б. Ташкоджаев, Б. Т. Салимов, *Химия природ. соединений*, 1997, 33, 254 [*Chem. Nat. Compd.*, 1997, 33, 190 (Engl. Transl.)].
3. B. Quintero and M. A. Miranda, *Ars Pharmaceutica*, 2000, 41, 27.

4. S. E. Thomas and M. L. Wood, *Br. Med. J.*, 1986, **292**, 992.
5. L. Langseth, *Oxidants, Antioxidants and Disease Prevention*. Belgium, International Life Science Institute, 1996.
6. Н. А. Панкрушина, И. А. Никитина, Н. В. Анферова, С. А. Осадчий, М. М. Шакиров, Э. Э. Шульц, Г. А. Толстикова, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2003, 2354 [*Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, 2003, **52**, 2490].
7. A. Beeby and A. E. Jones, *Photochem. Photobiol.*, 2000, **72**, 10.
8. K.-J. Schleifer, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 2204.
9. N. E. Polyakov, M. B. Taraban, and T. V. Leshina, *Photochem. Photobiol.*, 2004, **80**, 21.
10. N. E. Polyakov, V. K. Khan, M. B. Taraban, T. V. Leshina, O. A. Luzina, N. F. Salakhutdinov, and G. A. Tolstikov, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 881.
11. S. N. Wright, *Mol. Pharmacol.*, 2001, **59**, 183.
12. M. E. Gellens, A. L. George Jr., L. Chen, M. Chahine, R. Horn, R. L. Barchi, and R. G. Kallen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 554.
13. K. M. Salikhov, Yu. N. Molin, R. Z. Sagdeev, and A. L. Buchachenko, *Spin Polarization and Magnetic Effects in Radical Reactions*, Academiai Kiadó, Budapest, Hungary, 1984.
14. I. M. Magin, A. I. Kruppa, T. V. Leshina, V. Lysis, D. Muceniece, and G. Duburs, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2003, **155**, 119.
15. M. B. Taraban, A. I. Kruppa, M. G. Voronkov, V. I. Rakhlin, S. V. Grigor'ev, O. S. Volkova, N. E. Polyakov, R. G. Mirskov, and T. V. Leshina, *J. Organomet. Chem.*, 2002, **658**, 228.
16. M. B. Taraban, N. E. Polyakov, O. S. Volkova, L. V. Kuibida, T. V. Leshina, M. P. Egorov, and O. M. Nefedov, *J. Organomet. Chem.*, 2006, **691**, 1411.
17. S. S. Petrova, A. I. Kruppa, and T. V. Leshina, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **385**, 40.
18. N. E. Polyakov and T. V. Leshina, *Mol. Phys.*, 2002, **100**, 1297.
19. N. E. Polyakov, A. I. Kruppa, V. S. Bashurova, T. V. Leshina, E. S. Hand, and L. D. Kispert, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2002, **153**, 111.
20. N. E. Polyakov, V. S. Bashurova, T. V. Leshina, O. A. Luzina, and N. F. Salakhutdinov, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2002, **153**, 77.
21. М. С. Юнусов, Г. А. Толстикова, Ю. И. Муринов, Е. М. Цырлина, Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, Т. В. Воевода, С. Г. Юнусова, В. А. Докичев, Н. В. Каверина, А. И. Турилова, Пат. РФ № 2180583 от 20.03.2002, *Бюл. изобрет.*, 2002, № 8, с. 148.
22. В. Н. Майстренко, В. Н. Гусаков, Ю. И. Русаков, Ю. И. Муринов, Г. А. Толстикова, *Докл. АН*, 1994, **335**, 329 [*Dokl. Chem.*, 1994 (Engl. Transl.)].
23. А. И. Арчаков, А. П. Селзовский, В. И. Лисов, Д. И. Цыганов, В. А. Князев, О. М. Ипатова, Т. И. Торховская, *Биомед. химия*, 2002, **48**, 139.
24. N. E. Polyakov, V. K. Khan, M. B. Taraban, T. V. Leshina, N. F. Salakhutdinov, and G. A. Tolstikov, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 24526.
25. P. J. Wagner, A. E. Kemppainen, and T. Jellinek, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 7512.
26. P. J. Wagner and E. J. Siebert, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 7335.
27. M. Goetz and I. Sartorius, *J. Phys. Chem. A*, 2003, **107**, 8539.
28. J. Saluberlich, O. Brede, and D. Beckert, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 5659.
29. F. M. Xie, H. C. Wang, J. H. Li, H. L. Shu, J. R. Jiang, J. P. Chang, and Y. Y. Hsien, *Biomed. Chromatogr.*, 1990, **4**, 43.
30. N. E. Polyakov, M. B. Taraban, T. V. Leshina, O. A. Luzina, N. F. Salakhutdinov, and G. A. Tolstikov, *J. Phys. Chem. B*, 2007, in press.
31. Yu. P. Tsentalovich, O. B. Morozova, A. V. Yurkovskaya, and P. J. Hore, *J. Phys. Chem. A*, 1999, **103**, 5362.
32. M. Tomkiewicz, R. D. Mc Alpine, and M. Cocivera, *Can. J. Chem.*, 1972, **50**, 3849.
33. V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, and T. V. Leshina, *J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2007, in press.
34. Y. P. Tsentalovich, J. J. Lopes, P. J. Hore, and R. Z. Sagdeev, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2002, **58**, 2043.
35. P. J. Hore, S. L. Winder, C. H. Roberts, and C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 5049.
36. I. Saito, H. Ikehira, R. Kasatani, M. Watanabe, and T. Matsuura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 3115.
37. С. С. Остахов, Е. М. Цырлина, С. Г. Юнусова, М. С. Юнусов, В. П. Казаков, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1997, 736 [*Russ. Chem. Bull.*, 1997, **46**, 705 (Engl. Transl.)].
38. A. Beeby and A. E. Jones, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2001, **64**, 109.
39. *Landolt-Bornstein New Series, Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology, Magnetic Properties of Free Radicals, V. II/9, part b*, Eds H. Fischer and K.-H. Hellwege, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
40. Yu. P. Tsentalovich and O. B. Morozova, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2000, **131**, 33.
41. N. E. Polyakov, T. V. Leshina, A. Petrenko, E. Hand, and L. D. Kispert, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2003, **161**, 261.
42. N. E. Polyakov, T. V. Leshina, N. F. Salakhutdinov, and L. D. Kispert, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 6991.
43. K. A. Connors, *Chem. Rev.*, 1996, **97**, 1325.
44. Е. Ю. Сангалов, *Журн. общ. химии*, 1999, **64**, 641 [*Russ. J. Gen. Chem.*, 1999, **64** (Engl. Transl.)].
45. N. E. Polyakov, T. V. Leshina, N. F. Salakhutdinov, T. A. Konovalova, and L. D. Kispert, *Free Rad. Biol. Med.*, 2006, **40**, 1804.

Поступила в редакцию 12 декабря 2006;
после доработки — 5 апреля 2007