ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ «МЕЖДУНАРОДНЫЙ ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ ЦЕНТР» СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЖУРАВЛЕВА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

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

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

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель Кандидат физико-математических наук Шерин Петр Сергеевич

Новосибирск, 2024

Оглавление СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	. 14
1.1. Источники свободных радикалов аминокислот и аминокислотных остатков триптофана и тирозина <i>in vivo</i>	. 14
1.1.1. АФК и окислительный стресс	. 14
1.1.2. Образование радикалов триптофана и тирозина под действием УФ излучения	. 16
1.2. Продукты радикального повреждения аминокислотных остатков триптофана и тирозина in vivo	19
1.2.1. Кросс-сшивки	. 19
1.2.2. Оксигенированные формы	. 21
1.3. Ткань хрусталика глаза как удобная модель для исследования последствий радикальных реакци	й
1.3.1. Строение хрусталика	. 22 . 23
1.3.2. Состав ткани хрусталика	. 24
1.3.3. Физико-химические свойства среды ткани хрусталика	. 27
1.4. Фотохимические свойства кинуренинов и продуктов их термического разложения	. 27
1.4.1. Фотохимические свойства кинуренинов	. 27
1.4.2. Термическая нестабильность кинуренинов и их фотохимически активные продукты	. 30
1.4.3. Спектральные и фотохимические свойства кинуреновой кислоты в основном и возбужденн триплетном состоянии	ом . 31
1.4.4. Кинуреновая кислота как компонент антиоксидантной защиты клеток	. 34
1.5. Механизмы и продукты реакций радикала триптофана в модельных средах	. 35
1.5.1. Внутримолекулярный перенос электрона в цепи аминокислотных остатков триптофана и тирозина	. 35
1.5.2. Образование кросс-сшивок между остатками триптофана	. 36
1.5.3. Образование оксигенированных форм триптофана	. 39
1.5.4. Образование ковалентных сшивок триптофана с молекулами фотосенсибилизаторов	. 43
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	. 45
2.1. Используемые реагенты	. 45
2.2. Оптическая спектроскопия	. 45
2.3. Лазерный импульсный фотолиз	. 46
2.4. Стационарный фотолиз	. 47
2.5. Импульсный фотолиз	. 47
2.6. Высокоэффективная жидкостная хроматография с оптическим детектированием (ВЭЖХ-УФ)	. 47
2.7. Расчёт квантовых выходов фоторазложения исходных реагентов	. 48
2.8. Анализ ферментативной активности лизоцима	. 49
2.9. Ферментативный гидролиз HEWL	. 49

2.10. Масс-спектрометрия	49
2.11. Гель-электрофорез	50
ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ МЕЖДУ ТРИПЛЕТНЫМ СОСТОЯНИЕМ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И АМИНОКИСЛОТОЙ ТРИПТОФАН	52
3.1. Выбор экспериментальных условий	52
3.2. Установление механизма реакции между ³ КNAH и TrpH	53
Заключение по материалам главы 3	60
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ _Р Н НА МЕХАНИЗМЫ И ПРОДУКТЫ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ РЕАКІ МЕЖДУ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ И АМИНОКСИЛОТАМИ ТРИПТОФАН И ТИРОЗИН В СВОБОДНОМ СОСТОЯНИИ	ЦИЙ 62
4.1. Выбор экспериментальных условий	62
4.2. Распад реагентов при УФ-А-сенсибилизированном фотолизе	64
4.3. Анализ продуктов УФ-А-сенсибилизированного фотолиза	65
4.4. Увеличение константы скорости обратного переноса электрона от KNAH2 ^{•—} к TrpH ^{•+} при ни значениях pH	зких 68
4.5. Реакция радикала KNAH [—] с молекулярным кислородом	71
Заключение по материалам главы 4	72
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ _Р Н НА МЕХАНИЗМЫ И ПРОДУКТЫ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ РЕАКІ МЕЖДУ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ И АМИНОКИСЛОТНЫМИ ОСТАТКАМИ ТРИПТОФАН ТИРОЗИНА В СОСТАВЕ БЕЛКА ЛИЗОЦИМА	ЦИЙ ІА И 74
5.1. Влияние pH на реакцию между ³ KNAH ⁻ и HEWL	74
5.2. Значение pKa катион-радикала TrpH в составе HEWL	77
5.3. Реакции радикалов KNAH [—] и HEWL	78
5.4. Гибель радикалов KNAH [—] и HEWL при различных значениях pH	79
5.5. УФ-А-фотолиз KNAH [—] и HEWL при разных значениях pH	81
5.6. Ферментативная активность HEWL до и после УФ-А фотолиза при различных значениях рН	i 82
5.7. Анализ кросс-сшивок HEWL с помощью гель-электрофореза	83
5.8. ВЭЖХ-УФ-МС анализ продуктов фотолиза с низкой молекулярной массой	84
5.9. ВЭЖХ-УФ-МС анализ HEWL до и после УФ-А фотолиза	86
5.10. Трипсинолиз HEWL после УФ-А фотолиза	87
5.11. Оксигенирование остатков метионина и триптофана. Потеря молекулы воды оксигенирован формами TrpH	ными 88
5.12. Ковалентное присоединение KNAH ⁻ к HEWL	92
5.13. Образование TrpH- и ТуrOH-содержащих кросс-сшивок HEWL	93
Обсуждение и заключение по материалам главы 5	95
ГЛАВА 6. ДИСПРОПОРЦИОНИРОВАНИЕ И ДИМЕРИЗАЦИЯ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ПО ДЕЙСТВИЕМ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ	Д 97
6.1. Предполагаемая схема реакций	97
6.2. Установление механизма УФ-индуцированного диспропорционирования KNAH [—]	98

6.3. Димеризация KNAH [—] под действием УФ-А излучения	100
Заключение по материалам главы 6	102
ГЛАВА 7. МЕХАНИЗМ И ПРОДУКТЫ РЕАКЦИИ МЕЖДУ РАДИКАЛОМ ТРИПТОФАНА И СУПЕРОКСИД-АНИОНОМ	105
7.1. Схема реакций и выбор условий эксперимента	105
7.2. Восстановление основных состояний реагентов в радикальных реакциях	107
7.2.1. Восстановление NTrpH	107
7.2.2. Восстановление KNAH [—]	109
7.3. Поиск схемы радикальных реакций	111
7.4. Распад реагентов при УФ-А-фотолизе	117
7.5. Накопление продуктов УФ-А-фотолиза	119
7.6. Оценка выходов продуктов фотолиза триптофана на основе кинетической схемы. Сравнение	
результатов с экспериментальными значениями	123
Заключение по материалам главы 7	125
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕАТУРЫ	127
ПРИЛОЖЕНИЕ	145

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

Химические соединения:

- АФК активные формы кислорода
- TrpH триптофан
- NTrpH N-ацетил-триптофан
- TyrOH тирозин
- NTyrOH N-ацетил-тирозин
- $\Phi C \phi$ отосенсибилизатор
- ³ФС триплетное состояние фотосенсибилизатора
- О2 супероксид-анион
- КNАН[—]– анион кинуреновой кислоты, присутствующий в водных растворах при рН 2.5-11.6
- ³КNAH[—]– триплетное состояние кинуреновой кислоты, присутствующее в водных растворах

при рН 7

- НО гидроксильный радикал
- HO2[•] гидропероксильный радикал
- ¹О₂ синглетное возбужденное состояние О₂
- СОД супероксиддисмутаза
- ПТМ пост-трансляционные модификации
- CysSH цистеин
- His гистидин
- NFK N-формилкинуренин
- NNFK N-ацетил-N-формилкинуренин
- Куп кинуренин
- OIА оксиндолаланин
- NOIA N-ацетил-оксиндолаланин
- GSH глутатион восстановленный
- Asc аскорбат, анион аскорбионовой кислоты
- 4HQN 4-гидрокисхинолин
- ddOKNA1 2,2'-(1,2-дигидроэтан-1,2-диил)дихинолин-4(1H)-он
- ddOKNA2 4,4'-би(1,4-дигидро-2-карбоксихинолин)
- 1,4-DHQ 1,4-дигидро-2-карбоксихинолин
- HPI 2-карбокси-3α-гидроксипирролоиндол
- NHPI N-ацетил-2-карбокси-3α-гидроксипирролоиндол
- НРРІ За-гидропероксипирролоиндол
- NHPPI N-ацетил-За-гидропероксипирролоиндол

HEWL – лизоцим белка куриного яйца (hen egg white lysozyme)

Методы:

TA – промежуточное поглощение (transient absorption)

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

МС - масс-спектрометрия

RT – время удержания вещества на хроматографической колонке (retention time)

ХПЯ – химически индуцированная поляризация ядер

Физико-химические величины:

рН – водородный показатель

 $\Phi-$ квантовый выход

КИЭ – кинетический изотопный эффект

Процессы и явления:

ОС – окислительный стресс

УФ – ультрафиолетовый

УФ-А – ультрафиолетовое излучение в диапазоне длин волн 315-400 нм

УФ-В – ультрафиолетовое излучение в диапазоне длин волн 280-315 нм

УФ-С – ультрафиолетовое излучение в диапазоне длин волн 100-280 нм

ET – механизм переноса электрона (electron transfer)

PCET – механизм последовательного переноса электрона и протона (proton-coupled electron transfer)

HT – перенос атома водорода (hydrogen transfer)

ОПЭ – обратный перенос электрона

Термины

Оксигенированные формы – продукты присоединения атомов О к аминокислотам.

Кросс-сшивка – продукт ковалентного связывания двух аминокислот.

Тип фотоповреждений Ia – прямые реакции между радикалами аминокислот/белков и радикалами ФС.

Тип фотоповреждений Ib − реакции между радикалами аминокислот/белков и O₂^{•−}, образованным в реакции между радикалом ФС и O₂.

Тип фотоповреждений II – реакции аминокислот/белков с ¹О₂, образованным в реакции между ³ФС и О₂.

введение

Актуальность темы исследования

Согласно свободнорадикальной теории старения, предложенной Д. Харманом в 1950-х годах XX века [1], возрастная потеря функций органов и тканей обусловлена накоплением необратимых окислительных повреждений компонентов живых тканей. Предполагается, что в качестве окисляющих клеточных агентов могут выступать свободные радикалы, а также активные формы кислорода (АФК), представляющие частично восстановленные метаболиты молекулярного кислорода. Многочисленные исследования продемонстрировали увеличение количества АФК и степени окислительного повреждения с возрастом [2], а также увеличение или уменьшение продолжительности жизни различных модельных организмов при снижении или повышении, соответственно, окислительного повреждения в клетках [3]. На сегодняшний день принципиальная роль окислительных повреждений в процессе старения так и осталась недоказанной [4], однако их значимая, а порой и основная роль показана в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [5,6], хронической болезни почек [7], нейродегенартивных болезней [8,9], катаракты [10], диабета [11] и других заболеваний.

Для предотвращения и уменьшения количества повреждений белков, вызванных реакциями АФК и их радикальных продуктов, клетки обладают набором систем антиоксидантной защиты [12,13,14]. Условия увеличения концентрации АФК и свободных радикалов и одновременное нарушение работы антиоксидантных систем организма известны как окислительный стресс (ОС) [15]. В условиях ОС среди клеточных компонентов белки являются наиболее представленными мишенями для АФК в силу двух факторов. Во-первых, белки составляют большую часть сухой массы клетки. Во-вторых, структурные белки, например коллаген кожи и кристаллины хрусталика глаза, могут не обновляться на протяжении десятилетий и даже всей жизни организма, а потому способны накапливать окислительные повреждения. Наиболее ярким примером важности окислительного повреждения белков является хрусталик глаза, ядро которого сформировано белками, образующимися при развитии эмбриона и присутствующими в составе хрусталика на протяжении всей жизни человека. С течением времени накопление повреждений приводит к изменению макроскопических характеристик хрусталика – увеличению жесткости, светорассеяния и приобретению желтой окраски. Увеличение светорассеяния является признаком развития катаракты [16,17] – самой распространенной формы слепоты во всем мире.

Среди аминокислотных остатков, входящих в состав белков, остатки триптофана (TrpH) и тирозина (TyrOH) являются особенно уязвимыми для окислительных повреждений вследствие легкости их одноэлектронного окисления [18]. Реакции TrpH и TyrOH с некоторыми АФК и свободными радикалами приводят к образованию свободных радикалов Trp[•] и TyrO[•],

соответственно. В случае наружных тканей, подвергающихся воздействию ультрафиолетового излучения (УФ), таких как кожа и хрусталик глаза, к числу окислителей также относятся возбужденные триплетные состояния природных фотосенсибилизаторов (ФС). Значимость фотоповреждений TrpH и TyrOH для хрусталика глаза также повышена вследствие повышенного содержания ароматических аминокислотных остатков в составе белков данной ткани [19].

Среди продуктов повреждения TrpH и TyrOH in vivo можно выделить два класса соединений – модификации с присоединением одного и более атомов кислорода, т.н. оксигенированные формы, и ковалентные сшивки (кросс-сшивки) с другими аминокислотными остатками. Оксигенированные формы ТгрН являются наиболее распространенными продуктами повреждения TrpH in vivo. Повышенное содержание данных модификаций TrpH обнаруживается в местах протекания воспалительных процессов, а также при развитии некоторых дегенеративных заболеваний [13]. Внутри- и межбелковые кросс-сшивки между ароматическими системами остатков TrpH и TyrOH представлены различными сочетаниями -ТгрН/ТгрН, ТугОН/ТугОН и ТгрН/ТугОН. Широко изученные кросс-сшивки между остатками ТугОН являются характерным признаком развития многих возрастных дегенеративных расстройств – болезни Паркинсона [20], Альцгеймера [21], а также атеросклероза [22]. Менее изученные TrpH-содержащие кросс-сшивки недавно были обнаружены в составе хрусталика глаза, пораженного катарактой [23]. Предполагается, что подобные кросс-сшивки белков могут давать вклад в образование светорассеивающих белковых агрегатов в хрусталике при развитии катаракты.

Сложный химический состав клеток и малая концентрация радикалов в тканях затрудняет изучение радикальных реакций *in vivo*, поэтому исследователи прибегают к использованию простых модельных систем с известным составом. Одним из наиболее удобных методов генерации высоких концентраций свободных радикалов является фотолиз аминокислот в присутствии ФС. Ряд исследований [24,25,26,27] показал, что основными продуктами радикальных реакций TrpH в таких системах являются оксигенированные формы TrpH и кросссшивки Trp-Trp, что указывает на возможность применения фотосенсибилизированного фотолиза TrpH для изучения механизмов формирования биологически значимых модификаций TrpH. Кинуреновая кислота (kynurenic acid, KNAH[—], присутствует в виде аниона в водных растворах при pH 7), являющаяся естественным метаболитом хрусталика глаза человека, демонстрирует свойства высокоэффективного ФС, что делает KNAH[—] удобным модельным соединением для генерации Trp'в фотохимических системах [25,28].

Степень разработанности темы исследования

Общие представления о биологически значимых свободнорадикальных реакциях были сформулированы ранее, но механизмы и непосредственные продукты их реакций с клеточными компонентами остаются во многом неизвестными. В частности, доминирующее число исследований радикальных реакций проведено для водных растворов при pH 7, однако известно, что ОС зачастую сопровождается снижением pH клеточной среды [29,30,31], что необходимо учитывать при моделировании физико-химических механизмов действия АФК и свободных радикалов *in vivo*. Понимание того, как условия среды влияют на механизмы накопления окислительных повреждений, может помочь в разработке новых подходов к замедлению и предотвращению наиболее опасных последствий ОС для клеток и тканей.

В модельных экспериментах, использующих фотолиз TrpH в присутствии KNAH⁻⁻, накапливаются и другие модификации TrpH, которые не были обнаружены на сегодняшний день в хрусталике, но которые, учитывая биологическую распространенность KNAH⁻⁻, могут играть важную роль при дальнейшем повреждении белковых молекул *in vivo*. К таким продуктам относятся ковалентные сшивки между TrpH и KNAH⁻⁻, механизм образования которых остаётся неясным. Информация о механизмах образования и свойствах данных продуктов позволит получить более глубокое представление о процессах фотохимического повреждения компонентов наружных тканей.

Одним из источников оксигенированных форм TrpH *in vivo* в условиях OC может являться реакция Trp' с супероксид-анионом ($O_2^{\bullet-}$), важнейшим источником AФK в клетках. Несмотря на значимость данной реакции для биохимии окислительного повреждения белков, в настоящее время информация о её механизе остается противоречивой, и выход оксигенированных форм TrpH в ней оценивается в различных исследованиях на уровне < 5% или 100%. Разрешение данного противоречия позволит сделать окончательный вывод о том, насколько опасным источником оксигенирования TrpH является реакция между Trp' и O₂^{•-}.

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

В ходе работы были поставлены и успешно решены следующие задачи:

- Определение механизма реакции между триплетным состоянием KNAH⁻ (³KNAH⁻) и ТrpH как источника Trp[•] в фотохимической системе.
- Установление влияния pH на механизмы и состав продуктов радикального повреждения как аминокислоты TrpH, так и аминокислотного остатка TrpH в составе лизоцима белка куриного яйца (Hen Egg White Lysozyme, HEWL), выбранного в качестве модельного белка.

9

- Установление радикального предшественника ковалентных сшивок между TrpH и KNAH⁻.
- 4. Определение механизма реакции между Trp[•] и O₂^{•—} как потенциального источника оксигенированных форм TrpH *in vivo*.

Научная новизна работы

В ходе исследований реакции ³КNAH[—] и ТгрН был описан ранее неизвестный вариант механизма последовательного переноса электрона и протона (proton-coupled electron transfer, PCET), при котором протон переносится непосредственно к акцептору электрона – триплетному состоянию Φ C, ³ Φ C. Впервые были установлены механизмы влияния pH раствора на кинетику радикальных реакций ТгрH и, как следствие, характер повреждений ТгрH как в случае аминокислоты, так и аминокислотного остатка ТгрH в составе белка. В ходе поиска радикального предшественника ковалентных сшивок между ТгрH и KNAH[—] было показано существование ранее неизвестной реакции фотоиндуцированого диспропорционирования KNAH[—]. Механизм реакции между Тгр[•] и O₂^{•—} был впервые исследован при помощи регистрации кинетики восстановления основного состоянии ТгрH и анализа кинетики гибели Тгр[•], что позволило разрешить противоречия между результатами ранних исследований.

Практическая значимость полученных результатов

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

Методология и методы исследования

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

спектрометрическим (МС) детектированием продуктов. Для оценок выходов кросс-сшивок HEWL был использован метод гель-электрофореза в полиакриламидном геле.

Положения, выносимые на защиту

1. Ранее неизвестный для TrpH вариант механизма последовательного переноса электрона и протона от TrpH к ³KNAH⁻ с непосредственным переносом протона к акцептору электрона без участия растворителя. Образование Trp[•] и KNAH₂^{•-} как непосредственных продуктов реакции между TrpH и ³KNAH⁻.

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

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

4. Высокий выход оксигенированных форм TrpH в реакции между Trp[•] и $O_2^{•-}$ делает данную реакцию опасным источником повреждения TrpH. KNAH⁻ не является эффективным фотохимическим генератором $O_2^{•-}$.

Степень достоверности и апробация результатов исследований

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

Апробация работы

Материалы, изложенные в диссертации, докладывались и обсуждались на следующих научных конференциях: XVII Конгрессе Международного Союза по Фотобиологии (Барселона,

Испания, 2019 г.), XI Международной конференции для молодых ученых по химии (Санкт-Петербург, Россия, 2019 г.), Центрально-европейской конференции по фотохимии (Бад Хофгаштайн, Австрия, 2020 г.), XIII Симпозиуме «Современная химическая физика» (Туапсе, Россия, 2021 г.) и X Международной конференции им. В.В. Воеводского «Физика и химия элементарных химических процессов» (Новосибирск, Россия, 2022 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в международных журналах, входящих в перечень ВАК.

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

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

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

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

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

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

Диссертационная работа соответствует п. 1 («Механизмы химического превращения, экспериментальные методы исследования структуры и динамики химических превращений») и п. 9 («Строение, структура и реакционная способность интермедиатов химических реакций») паспорта специальности 1.3.17 «химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества» для химической отрасли науки.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Диссертация изложена на 189 страницах и включает 21 таблицу (из них 11 в приложении), 68 рисунков (из них 38 в приложении), 14 схем (из них 1 в приложении). Библиография включает 280 литературных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Источники свободных радикалов аминокислот и аминокислотных остатков триптофана и тирозина *in vivo*

Реакции белков с одно- и двухэлектронными окислителями могут приводить к модификации боковых цепей белка, фрагментации боковых и пептидных цепей, образованию олигомеров, а также изменению конформации биополимеров [13,14]. Исследованию роли окислительного повреждения белков в развитии заболеваний и в процессах старения долгое время уделялось мало внимания, в отличие от повреждения липидов и ДНК, что можно частично объяснить сложностью непосредственной демонстрации того, как окислительные модификации и изменения в функциях белков влияют на возникновение заболеваний. Кроме того, долгое время считалось, что поврежденные или аномально сформированные белки не могут накапливаться в клетках в существенных количествах, так как данные макромолекулы постоянно утилизируются клеточными системами и замещаются вновь синтезированными белками [2]. Однако последующие исследования долгоживущих структурных белков, таких как коллаген кожи [32] и кристаллины хрусталика глаза [33], показали, что эти биополимеры могут присутствовать в организме в течение десятилетий и даже всей жизни [34]. Вместе с тем фактом, что белки составляют большую часть сухой массы клетки, эта особенность делает белки основной мишенью окисляющих агентов клеток [35]. Среди структурные аминокислотных остатков белков TrpH и TyrOH являются одними из наиболее подверженных одноэлектронному окислению, что обусловливает интерес к реакциям свободных радикалов данных аминокислот. Настоящий раздел посвящён биологически значимым источникам свободных радикалов TrpH и TyrOH, известным на сегодняшний день.

1.1.1. АФК и окислительный стресс

К АФК относят некоторые частично восстановленные метаболиты молекулярного кислорода, такие как O₂^{•-}, гидропероксильный радикал (HO₂[•]), гидроксильный радикал (HO[•]), пероксид водорода (H₂O₂), а также электронно-возбужденное состояние кислорода, синглетный кислород, ¹O₂, и некоторые другие частицы [36]. Данные частицы обладают высокой реакционной способностью и быстро вступают в реакции с некоторыми компонентами живых тканей.

Источником O₂^{••} в живых клетках является побочный процесс утечки электронов из дыхательной цепи переноса электронов митохондрий, когда молекулярный кислород, O₂, приобретает один электрон [37]. O₂^{••} проявляет крайне низкую реакционную активность по отношению к большинству клеточных соединений [38] и в водном растворе, в отсутствие других реагентов, исчезает в реакции неферментативной дисмутации в течение миллисекунд

[39], см. Схему 1.1. Наряду с неферментативными путями гибели $O_2^{\bullet-}$ в клетках живых организмов также протекают реакции ферментативной дезактивации $O_2^{\bullet-}$, например, в реакции с супероксиддисмутазой (СОД), катализирующей дисмутацию $O_2^{\bullet-}$ в H₂O₂ [40], см. Схему 1.1. Особая роль $O_2^{\bullet-}$ в развитии ОС состоит в том, что данная частица является предшественником большей части других АФК *in vivo*, см. Схему 1.1.



Схема 1.1. Пути дисмутации O₂[•] и образования некоторых АФК из O₂[•].

Кроме того, реакции $O_2^{\bullet-}$ с некоторыми соединениями, присутствующими в живых системах, запускают каскад реакций образования других высокореакционных радикалов. Например, $O_2^{\bullet-}$ является источником высокореакционных радикалов 'NO₂ и CO₃^{•-} [41,42,43], см. Схему 1.2.

$$O_2^{\bullet-} \xrightarrow{\text{NO}^{\bullet}} O_1^{\bullet-1} \xrightarrow{\text{ONOO}^{-}} O_1^{\bullet-1} \xrightarrow{\text{CO}_2} O_2^{\bullet-1} \xrightarrow{\text{NO}_2} O_2^{\bullet-1} \xrightarrow{\text{OO}_2} O_$$

Схема 1.2. Путь образования радикалов 'NO₂ и CO₃^{•-} из O₂^{•-}.

Среди аминокислот, входящих в состав белков, аминокислотные остатки TrpH и TyrOH (см. химические структуры TrpH и TyrOH на Схеме 1.3) являются одними из наиболее распространенных мишеней для высокореакционных частиц OH^{*}, 'NO₂ и CO₃^{*—} [44,45]. Реакции TrpH и TyrOH с данными частицами приводят к образованию свободных радикалов Trp^{*} [46] и TyrO^{*} [46,47,48], а также радикальных аддуктов [49,50].

Высокая чувствительность ароматических систем TrpH и TyrOH к одноэлектронному окислению [51,52] объясняется низкими значениями окислительно-восстановительных потенциалов (E°) пар TrpH/Trp* и TyrOH/TyrO* при физиологическом pH \approx 7, равными 1.02 и 0.93 В, соответственно [18,53,54]. TrpH и TyrOH входят в число трёх наиболее легко окисляемых аминокислотных остатков белков живых организмов, уступая лишь тиольной группе цистеина (CysSH), E° (CysSH/CysS*) = 0.92 В [55,56]. Чувствительность индольного кольца TrpH к окислению также обусловливает интерес к радикальным реакциям многочисленных производных TrpH, в т.ч. нейротрансмиттеров, поддерживающих функционирование центральной нервной системы, таких как серотонин, мелатонин и др. [57].



Схема 1.3. Химические структуры аминокислот ТгрН и ТугОН.

1.1.2. Образование радикалов триптофана и тирозина под действием УФ излучения

Накопление пост-трансляцилонных модификаций (ПТМ) белков в наружных тканях предрасполагает эти ткани к развитию таких заболеваний как рак кожи [58] и катаракта [59]. Предполагается, что УФ излучение Солнца является одним из внешних факторов, провоцирующих развитие окислительного стресса в клетках, а также инициирует образование ряда ПТМ. Ранее было показано, что УФ-индуцированные повреждения белков в живых тканях, приводят к их окраске, агрегации и, как следствие, потере водорастворимости [13,60,61]. Выделяют несколько спектральных диапазонов УФ излучения, достигающих поверхности планеты: УФ-С (100-280 нм), УФ-В (280-315 нм) и УФ-А (315-400 нм). Излучение УФ-С и УФ-В диапазонов эффективно поглощается озоновым слоем Земли, при этом УФ-С почти не достигает жителей планеты. Часть УФ-В излучения, достигающего поверхности планеты, задерживается наружными тканями организмов, например, роговицей глаза [62]. УФ-А диапазон излучения является наиболее интенсивной частью солнечного УФ излучения, достигающего поверхности планеты, и слабо поглощается облаками и оконным стеклом. Кроме того, УФ-А излучение – это единственная часть солнечного УФ излучения, способная проникать внутрь наружных тканей, таких как кожа [60] и хрусталик глаза [63]. Проникая внутрь наружных тканей, УФ-А излучение возбуждает эндогенные ФС кожи и органов зрения, запуская каскад фотохимических реакций, как правило необратимых, приводящих к повреждению, в первую очередь, белков.

В зависимости от того, принимает ли ${}^{1}O_{2}$ участие в передаче энергии УФ света, поглощенной ФС, на молекулу белка, выделяют два основных типа фотоповреждений белков. Фотоповреждения белков I типа происходят без участия ${}^{1}O_{2}$ и образуются в результате прямых реакций между свободными радикалами с участием радикальных центров в составе белка. Тип фотоповреждений II включает образование ${}^{1}O_{2}$ путем передачи энергии от ${}^{3}\Phi$ С на молекулу О₂ в основном состоянии, ${}^{3}O_{2}$ [64]. Рассмотрим данные типы фотоповреждений более подробно.

Одним из случаев фотоповреждения белков I типа является прямая фотоионизация аминокислотных остатков при поглощении квантов света с высокой энергией (> 4 эB, или < 310 нм) [65]. Фотоионизация приводит к образованию катион-радикал белка (*белок*⁺⁺) и

16

сольватированного электрона, e^-_{solv} . В дальнейших процессах e^-_{solv} может быть захвачен другой молекулой белка с образованием анион-радикала *белок*⁻⁻. Напрямую УФ-В свет в составе белков поглощают остатки TrpH, TyrOH, гистидина (His) и цистина (димера аминокислоты CysSH, связанного дисульфидным мостиком S-S), что, как правило, приводит к их повреждению в первую очередь. Спектры поглощения TrpH и TyrOH в водных растворах при pH 7 приведены на Рис. 1.1. В случае фотоионизации белков происходит их быстрая и необратимая деградация. Однако, поскольку солнечное УФ излучение, достигающее Земли, состоит более чем на 95% из УФ-А света и менее чем на 5% из УФ-В, прямая фотоионизация остатков TrpH, TyrOH и His в белках организмов не считается биологически значимым процессом.





Другим возможным путём образования свободных радикалов белков по реакциям Типа I являются реакции аминокислотных остатков с ³ Φ C, образующимися при поглощении УФ-А света Φ C. Как правило, дезактивация ³ Φ C в реакциях с аминокислотными остатками белков протекает по механизмам переноса электрона или атома водорода. Продуктами данных реакций являются свободные радикалы Φ C и белка, как правило, это анион-радикал Φ C (Φ C ^{•-}) и *белок*^{•+} в случае переноса электрона.

При достаточно низкой концентрации O_2 в реакционной смеси (анаэробные условия) доминирующими реакциями гибели радикалов *белок*⁺⁺ являются его реакции с ΦC^{--} и другими радикалами *белок*⁺⁺. Если же концентрация O_2 в реакционной смеси достаточно высока, чтобы радикал ΦC^{--} успевал окисляться O_2 с образованием O_2^{--} , то реакция между *белок*⁺⁺ и O_2^{--} также может вносить существенный вклад в повреждение белка. Данные подтипы фотоповреждения I были обозначены в работе Е. Д. Савиной и коллег [28] как подтип Ia для прямых реакций между ΦC^{--} и *белок*⁺⁺ и подтип Ib – для реакций *белок*⁺⁺ и O_2^{--} . Для удобства обозначения Ia и Ib будут в дальнейшем использованы в тексте настоящей работы. Общий принцип возникновения фотоповреждений I типа приведен на Схеме 1.4

Следует отметить, что присутствие природных ФС в наружных тканях может быть немитохондриальным источником O_2 в условиях дополнительным, протекания фотоповреждений по типу Ib. Таким образом, фотохимические реакции природных ФС могут запускать каскад реакций АФК, описанных в Разделе 1.1.1. Например, показано, что присутствующие в эпидермисе кожи птерины, действующие как ФС, способны вызывать окислительное повреждение нуклеотидов ДНК [66]. Также стоит отметить, что в ткани хрусталика, клетки которого преимущественно лишены митохондрий и, как следствие, метаболической и ферментативной активности, структурные белки всё же продолжают накапливать окислительные ПТМ [16,23,67], сходные с теми, что образуются при воздействии АФК [10]. Таким образом, химические свойства радикалов природных ФС важны для понимания немитохондриальных механизмов генерации АФК и возникновения ОС в наружных тканях.

Как было упомянуто ранее, сравнительно невысокие значения E°(TrpH/Trp') и Е°(ТугОН/ТугО') делают их основными мишенями для окислителей и, в частности, для высокореакционных ³ФС. Протекание таких реакций по наиболее распространенному механизму – переносу электрона от TrpH/TyrOH к ${}^{3}\Phi$ C – приводит к образованию свободных радикалов Trp' и TyrO', что обнаруживаются и в результате реакций TrpH и TyrOH с окисляющими агентами, см. Схему 1.1. Типичные константы скорости для таких реакций близки к диффузионным (> $10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$) [68,69]. Таким образом, УФ излучение также является важным источником Trp' и TyrO' в наружных тканях [45,70,71,72,73,74].





Тип фотоповреждений II, включающий участие ¹О₂, более характерен для аэробных сред, гораздо более распространенных в условиях живых клеток и тканей. Реакции ${}^{1}O_{2}$ с белками приводят к его присоединению преимущественно по ароматическим и серосодержащим аминокислотным остаткам с образованием эндопероксидов и цвиттер-ионов. Данные продукты, как правило, являются нестабильными и подвергаются дальнейшим реакциям. В итоге может происходить фрагментация и агрегация белка с изменением его физических и химических свойств (например, гидрофобности и заряда). Данные, приводимые в литературе [61], указывают на связь некоторых патологий человека, а также дисфункций клеток и тканей с фотоповреждениями II типа. Общий принцип возникновения фотоповреждений II типа приведен на Схеме 1.4.

1.2. Продукты радикального повреждения аминокислотных остатков триптофана и тирозина *in vivo*

1.2.1. Кросс-сшивки

Радикальные реакции, приводящие к повреждению TrpH и TyrOH, были изучены для ряда модельных систем [25,26,28,70,75,76,77]. Показано, что быстрые реакции между радикалами приводят к ряду продуктов, одними из которых являются TrpH- и TyrOH- содержащие кросс-сшивки. При этом ковалентные связи могут образовываться по разным положениям ароматических систем как между двумя остатками TrpH или TyrOH, так и между TrpH и TyrOH, что приводит к образованию широкого ряда продуктов типа Trp-Trp, Tyr(-H)OH- Tyr(-H)OH и Trp-Tyr(-H)OH. Данные продукты характерны как для радикального повреждения свободных аминокислот TrpH и TyrOH, так и для TrpH- и TyrOH-содержащих белков [27,28,78,79]. Более подробно механизмы образования кросс-сшивок между радикалами будут рассмотрены в Разделе 1.5.2.

Кросс-сшивки по остаткам TrpH и TyrOH, обнаруженные в тканях *in vivo*, являются в весьма специфическими маркерами радикального повреждения и, по-видимому, образуются в условиях сравнительно высоких концентраций радикалов и малых вкладов конкурирующих реакций. Данные связи могут образовываться как между аминокислотами внутри одной и той же белковой цепи, так и между аминокислотами двух разных цепей. В отличие от широко известных дисульфидных сшивок, играющих ключевую роль в определении структуры и функции белка [80], TrpH- и TyrOH-содержащие кросс-сшивки не могут быть восстановлены клеточными метаболитами, а потому данные продукты являются необратимыми ПТМ.

Интерес исследователей в области биологии и медицины к кросс-сшивкам вызван тем фактом, что подобные ПТМ играют важную роль во многих биологических процессах как при нормальных физиологических условиях, так и при развитии патологий. Кросс-сшивки через ароматические кислоты, обнаруженные *in vivo*, наиболее представлены примерами связей между аминокислотными остатками ТугОН. Показано, что ТугОН в составе димеров может быть связан как связью С-С между бензольными кольцами двух аминокислот, так и связью С-О через кислород гидроксильной группы ТугОН [81,82]. Дитирозиновые сшивки продуцируются клетками некоторых организмов при нормальных физиологических условиях как компоненты, придающие эластичность структурным белкам, например, при формировании экзоскелетов насекомых [83], и прочность защитным оболочкам бактерий [84,85], животных [86], дрожжей [87] и растений [88,89]. Кроме того, в некоторых структурных белках животных было обнаружено присутствие не только дитирозиновых кросс-сшивок, а также цепочек из трёх [83,90] и четырех остатков ТугОН [90]. Предполагается, что формирование таких олигомерных сшивок происходит в реакциях вторичных радикалов ТугОН-ТугО[•], см. Раздел 1.5.2.

В настоящее время считается, что в тканях человека кросс-сшивки тирозина, Туг(-H)OH-Туг(-H)OH, оказывают негативное влияние на биологическую функцию белков и тесно связаны с развитием некоторых патологий [77,91,92]. Токсический эффект накопления кросс-сшивок белков в живых тканях связан с образованием нерастворимых белковых агрегатов. Например, показано, что межмолекулярные дитирозиновые сшивки белка стабилизируют белковые полимеры альфа-синуклеина, образующиеся при болезни Паркинсона [20,93,94]. Также повышенные количества сшивок Туг(-H)OH-Tyr(-H)OH обнаружены в амилоидных бляшках тканей мозга при болезни Альцгеймера [21], липопротеинах низкой плотности, возникающих в результате окислительных поражений сосудов при развитии атеросклероза [22], в белках хрусталика глаза, где сшивки, по-видимому, возникают в результате фотоокисления аминокислот [34], в моче людей, больных диабетом [95], а также в плазме крови при гиперлипидемии [96]. Показано, что кросс-сшивки Туг(-H)OH-Туг(-H)OH, обнаруженные *in vivo* в области атеросклеротических поражений, могут формироваться при ферментативном образовании ТугО[•] в процессе активности фагоцитов человека [82].

Большой объем данных о формировании Туг(-H)ОН-Туг(-H)ОН в условиях окислительного стресса в биологической среде [36,97], их невосприимчивость к клеточным системам репарации и создание эффективных аналитических методов обнаружения и количественного определения данных кросс-сшивок стали основой для использования данных соединений в качестве биомаркеров окисления белков в клинических исследованиях [82,98,99,100]. Кроме того, на основе информации о механизмах синтеза Туг(-H)OH-Туг(-H)OH был разработан ряд искусственных биосовместимых материалов [101,102], а также искусственных ферментов с улученными функциями [103]. Для синтеза данных искусственных материалов используется высокоэффективная фотохимическая генерация TyrO[•] с использованием ФС [103,104].

В отличие от обилия информации, доступной о кросс-сшивках тирозина, в научной литературе присутствует гораздо меньше информации об аналогичных кросс-сшивках триптофана как о естественных ПТМ белков. Вероятно, причина ограниченного количества сообщений об этом типе кросс-сшивок состоит (1) в более низком содержании аминокислотных остатков TrpH в составе белков (< 2 % [105]), а также (2) в высокой сложности идентификации и количественной оценки содержания Trp-Trp. Последнее обусловлено многочисленностью димерных структур, включая регио- и стереоизомеры, которые могут образоваться при комбинировании двух Trp', неспаренный электрон которого делокализован по пиррольному и

бензольному кольцам. По этой же причине аналогичные кросс-сшивки, образующиеся при одновременной генерации Trp[•] и TyrO[•] в модельных средах, представлены смесью различных изомеров Trp-Tyr(-H)OH [28,106]. Так, с помощью масс-спектрометрического анализа, были описаны изомеры кросс-сшивок Trp-Tyr(-H)OH, образующиеся при инкубировании смеси свободных аминокислот TrpH и TyrOH с CO₃^{•-} [107], белков с пероксинитритом (ONOO⁻⁻) [108] и другими АФК [109]. Сложная смесь изомеров Trp-Tyr(-H)OH также обнаружена при УФ-облучении модельных пептидов [110] и белов в присутствии различных ФС [27,28,78,79], а также в белковых экстрактах бактерий, подвергнутых фотоокислению [111].

Предполагается, что кросс-сшивки по остаткам триптофана также могут сопровождать развитие различных патологий. На сегодняшний день образование сшивок по остаткам триптофана и тирозина *in vivo* обнаружено для белков хрусталика глаза, пораженных катарактой [23]. ПТМ белков, обнаруженные в тканях хрусталика при развитии катаракты, будут рассмотрены более подробно в Разделе 1.3.2.2. Также показано, что кросс-сшивки Trp-Trp образуются между молекулами СОД при воздействии H₂O₂ и CO₃^{*—} [73]. Существует гипотеза, что именно данный механизм агрегации СОД ответственен за формирование агрегатов этого белка при развитии болезни моторных нейронов – нейродегенеративного заболевания, при котором происходит паралич и последующая атрофия мышц [71,73,112,113].

1.2.2. Оксигенированные формы

Более широким классом ПТМ аминокислотных остатков ТгрН и ТугОН в белках, обнаруживаемых *in vivo* являются различные оксигенированные формы. Одними из наиболее часто обнаруживаемых оксигенированных продуктов ТгрН является форма TrpH(+O), оксиндолаланин (OIA), а также формы TrpH(+2O) – диоксиндолаланин (diOIA) и N-формилкинуренин (NFK). Потеря формильной группы NFK приводит к образованию ещё одного распространенного продукта оксигенирования TrpH – кинуренина (Kyn) – обусловливающего окрашивание белков в жёлтый цвет при окислении [114]. Структурные формулы оксигенированных продуктов TrpH приведены на Схеме 1.5.

Повышенные количества данных продуктов наблюдались в ряде образцов патологических тканей по сравнению с контролем [13,115]. Куп и NFK были найдены *in vivo* в составе белков митохондрий [116,117,118], ферментов, участвующих в окислительновосстановительных реакциях, связанных с АФК [116,119,120], в спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера [121], в белках легочных тканей, пораженных раком лёгкого [122] и др. Как и в случае кросс-сшивок, оксигенирование аминокислотных остатков ТгрН может ухудшать функционирование белков [123].



Схема 1.5. Химические структуры оксигенированных форм ТгрН.

Показано, что оксигенированные продукты реакций Trp', образующиеся в модельных системах, в основном представлены вышеупомянутыми соединениями (см. Схему 1.5). Однако важно отметить, что данные продукты оксигенирования образуются также во множестве других химических процессов, также протекающих *in vivo* [124]. По этой причине, в отличие от кросссшивок, оксигенированные формы TrpH редко служат маркерами радикальных реакций. Механизмы образования оксигенированных продуктов TrpH в реакциях с участием Trp' будут более подробно рассмотрены в Разделе 1.5.3.

Стоит отметить, что механизмы и продукты биологически значимых радикальных реакций, предположительно участвующих в процессах окислительного повреждения компонентов клеток при развитии ОС, как правило, изучаются *in vitro* при нейтральном значении pH. Однако на примере многих тканей показано, что ОС нередко сопровождается снижением значения pH биологической среды. Данное патологическое состояние – ацидоз – обнаружено при развитии ОС во многих тканях [29,30,125,126,127,128] и физиологических жидкостях [29,129]. Так как механизмы молекулярных процессов, лежащих в основе окислительных реакций, могут быть чувствительны к изменению pH, данный факт необходимо учитывать при моделировании физико-химических механизмов действия свободных радикалов *in vivo*.

1.3. Ткань хрусталика глаза как удобная модель для исследования последствий радикальных реакций

Накопление поврежденных белков особенно важно для тех тканей, где белки практически не обновляются на протяжении жизни индивидуума. Изучение механизмов действия АФК и свободных радикалов в клетках осложняется разнообразием состава внутриклеточной среды, протеканием в ней ферментативных процессов, постоянной утилизацией поврежденных макромолекул и синтезом новых. С этой точки зрения ткань хрусталика глаза млекопитающих рассматривается многими исследователями в качестве идеальной модели для исследования последствий ОС и старения человека. По причине отсутствия органелл, и, как следствие, ферментативной активности, в клетках хрусталика отсутствует обновление белков и липидов [33]. Таким образом, структурные белки находятся в ткани хрусталика на протяжении всей жизни индивидуума, от формирования на стадии эмбриона до его смерти [34,130].

С возрастом белки хрусталика накапливают многочисленные ПТМ [67], приводящие к макроскопическим изменениям в ткани хрусталика глаза: увеличению жесткости и окрашиванию в желтый цвет. В предельном случае накопление ПТМ приводит к потере водорастворимости с последующей агрегацией белков, что зачастую сопровождается образованием светорассеивающих областей [67,131]. Описанные изменения приводят к развитию катаракты – прогрессирующего помутнения хрусталика глаза, являющегося наиболее распространенной причиной слепоты во всем мире, от которого страдают десятки миллионов людей [132]. Механизмы окислительно-восстановительных реакций внутри хрусталика глаза, а также пути возникновения и прогрессирования катаракты в настоящее время остаются во многом неизвестными.

1.3.1. Строение хрусталика

Хрусталик является биологической линзой, основная функция которой состоит в пропускании видимого света и его фокусировании на сетчатке глаза. Расположение хрусталика в составе глаза и его строение показано на Рис. 1.2. Клетки хрусталика содержат очень высокие концентрации структурных белков вплоть до 400 мг/мл [67]. Концентрация белков возрастает от периферии к ядру хрусталика, что приводит к образованию градиента коэффициента преломления в ткани, необходимого для корректной фокусировки падающего света на сетчатку глаза.



Рис. 1.2. Хрусталик в составе глаза (слева) и его строение (справа).

Прозрачность хрусталика глаза в видимом диапазоне света (400-800 нм) обеспечивается двумя основными факторами. Во-первых, в клетках хрусталика отсутствуют ядра и другие органеллы, способные рассеивать свет. Во-вторых, хрусталик не содержит сосудистых систем: его снабжение питательными веществами происходит через транспорт низкомолекулярных соединений через мембраны клеток [133,134]. Прочные и тонкие клеточные мембраны

толщиной менее длины волны синего цвета (400 нм), а также практически полное отсутствие межклеточного пространства также вносят важный вклад в оптическую прозрачность хрусталика.

1.3.2. Состав ткани хрусталика

1.3.2.1. Молекулы с малым молекулярным весом

Кроме структурных белков, составляющих большую часть массы клеток, химический состав хрусталика включает молекулы с небольшим молекулярным весом до 900 Да, т.н. метаболиты. Эти вещества либо синтезируются в единственных метаболически активных эпителиальных клетках на внешней поверхности хрусталика [135], либо поступают внутрь хрусталика из водянистой влаги, омывающей переднюю часть хрусталика, см. Рис. 1.2. Некоторые метаболиты хрусталика распределены неравномерно по его объёму, с ярко выраженным различием концентраций между корой и ядром хрусталика, что указывает на протекание метаболических процессов внутри ткани [136]. Существенное различие обнаружено между составами здоровых и сопоставимых по возрасту катарактальных хрусталиков: концентрации почти всех метаболитов в здоровом хрусталике выше, чем в катарактальном [137]. В связи с этим предполагается, что развитие возрастной катаракты может возникнуть по причине метаболической дисфункции эпителиальных клеток хрусталика [137,138]. Кроме того, накопленные факты указывают на то, что фактором развития катаракты может быть появление диффузионного барьера для проникновения метаболитов от коры в сторону ядра хрусталика [139]. Появление диффузионного барьера в среднем возрасте (45-60 лет) [139,140] связывают с обнаруженным связыванием белков хрусталика с мембранными порами [141]. Как и для большинства мтаболитов хрусталика, концентрации свободных аминокислот в его составе снижаются при развитии катаракты. В частности, концентрация свободнх ТгрН и ТугОН в здоровых хрусталиках варьируется в пределах 110-180 и 40-50 нмоль/г и при развитии катаракты падает примерно в два раза, достигая уровней 60-100 и 20-40 нмоль/г, соответсвенно [137].

Можно выделить две группы соединений, играющих важную роль в защите кристаллинов от нежелательных модификаций. Первая группа – это антиоксиданты, вещества, защищающие хрусталик от окислительных повреждений. Вторая группа – это Куп (см. химическую структуру на Схеме. 1.5) и его производные, кинуренины, выполняющие функцию УФ-фильтров хрусталика, о чем более подробно будет изложено в Разделе 1.4.

Среди антиоксидантов, защищающих клетки хрусталика от ОС, самыми важными являются глутатион восстановленный (GSH) и аскорбат (Asc). Механизм действия GSH заключается в способности дезактивировать АФК, в т.ч. О₂^{.-} [142], и способности восстанавливать свободные радикалы, в т.ч. Тгр[.] и ТугО[.] [24]. Ярким примером ключевой роли

24

ОС в развитии возрастной катаракты является тот факт, что окисление белков ядра хрусталика, характерное для возрастной катаракты, может не происходить даже после 80 лет в случае, если концентрация GSH, поддерживается на уровне выше 2 мМ [16]. Аsc, кроме способности захватывать свободные радикалы [143], проявляет свойства эффективного тушителя возбужденных состояний ФС, что также предотвращает появление свободных радикалов [68,144].

1.3.2.2. Белки хрусталика глаза и их модификации при развитии катаракты

Протеомные исследования в сочетании с различными алгоритмами анализа массспектрометрических данных позволили охарактеризовать большое количество различных ПТМ структурных белков хрусталика, кристаллинов, выделенных из катарактальных хрусталиков [16,34,145]. Были обнаружены такие ПТМ, как фосфорилирование, дезамидирование, ацетилирование, усечение, рацемизация, оксигенирование, ковалентное сшивание, гликирование, метилирование и т.д. [34,59,146]. Концентрация белков с данными ПТМ увеличивается с возрастом, однако стоит отметить, что не все найденные ПТМ являются маркерами развития катаракты. Например, наиболее распространенная ПТМ – дезамидирование – не демонстрирует увеличения концентрации при развитии катаракты по сравнению с хрусталиками людей того же возраста [147].

Как показывают многочисленные *in vivo* и *in vitro* исследования, помутнение ядра хрусталика является следствием окисления кристаллинов, что говорит о вкладе ОС и АФК в развитие катаракты [10,142]. Косвенным подтверждением того, что повышенное содержание АФК может провоцировать развитие катаракты, является и тот факт, что данное заболевание зачастую развивается у больных сахарным диабетом [11]. Известно, что при данной болезни наблюдается общее повышение концентрации O_2 ⁻⁻ в метаболически активных клетках, при этом эффективность антиоксидантных систем, в т.ч. уровень СОД, существенно снижается [148].

Оксигенирование

Наиболее распространённой ПТМ кристаллинов при развитии ядерной катаракты является оксигенирование аминокислотных остатков, в первую очередь CysSH и метионина (MetSH) [16]. Степень окисления сульфгидрильных групп при прогрессировании катаракты огромна: более 90% сульфгидрильных групп белка модифицированы, при этом почти половина всех аминокислотных остатков MetSH белков ядра хрусталика окислены до сульфоксида метионина [149,150].

При развитии возрастной ядерной [147], а также врожденной катаракты [151] в составе кристаллинов хрусталика человека и животных были также обнаружены оксигенированные

формы TrpH. При этом количество данных ПТМ при возрастной ядерной катаракте было повышено по сравнению с нормальными хрусталиками людей того же возраста [147], что может указывать на связь данной ПТМ с развитием ядерной катаракты у человека.

Ковалентые кросс-сшивки

В настоящее время накопленные знания указывают на то, что агрегация кристаллинов с последующей потерей их водорастворимости является принципиально важным этапом формирования светорассеивающих областей внутри хрусталика глаза при развитии катаракты [17]. Внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи являются обычными ПТМ белков, найденными в возрастных и катарактальных хрусталиках [147]. Известно, что оценка количества белков с данными ПТМ осложнена окислением CysSH с образованием дисульфидных связей при проведении экстракции и последующей пробоподготовки образцов тканей [152]. При этом стоит отметить, что хрусталики, пораженные возрастной ядерной катарактой на самой содержат значительное количество даже ранней стадии, высокомолекулярных агрегатов, которые не растворяются после обработки денатурирующими (8 М раствор мочевины) [153] и восстанавливающими агентами (дитиотреитол). Данный факт указывает на присутствие ковалентных сшивок между белками, отличных от дисульфидных связей [34,152,154]. Так, в катарактальном хрусталике человека были обнаружены ковалентные сшивки, образующиеся посредством тиоэфирных связей (R-S-R) [155], повышенное содержание ковалентных сшивок между окисленными аминокислотными остатками лизина и аспартата [156], а также между гистидином и аланином [157]. Кросс-сшивки кристаллинов с участием остатка TrpH (Trp-Trp и Trp-Tyr(-H)OH) были недавно обнаружены в катарактальных хрусталиках глаз человека [23], что также не исключает их вклада патологические изменения структур кристаллинов. Как и в случае других тканей, см. Раздел 1.2.1, предполагается, что источником кросс-сшивок сшивок с участием TrpH и TyrOH являются свободнорадикальные реакции [24].

Ковалентное сшивание белков с малыми молекулами

Одной из причин приобретения желтой окраски катарактальных хрусталиков является появление ковалентных сшивок кристаллинов с различными производными свободной аминокислоты TrpH, являющимися природными метаболитами хрусталика глаза [158]. Например, для кристаллинов известны ПТМ ковалентного присоединения Kyn [159] и его производных [160], содержание которых существенно увеличивается после среднего возраста. Механизм образования и фотохимические свойства данных ПТМ будут более подробно рассмотрены в Разделе 1.4.2.

1.3.3. Физико-химические свойства среды ткани хрусталика

В данном разделе приведены основные особенности физико-химических свойств, выделяющие внутриклеточную среду хрусталика от сред, характерных для большинства клеток человеческого организма.

Важнейшей особенностью хрусталика, позволяющей ему сохранять прозрачность на протяжении многих десятилетий жизни индивида, является крайне низкое содержание кислорода внутри ткани, $C(O_2) < 2$ мкМ [161]. Как было отмечено ранее, внутри ядра хрусталика глаза отсутствуют митохондрии – основной источник $O_2^{\bullet-}$ метаболически активных клеток. Учитывая тот факт, что ткань хрусталика подвергается постоянному солнечному УФ-А излучению, фотохимические реакции ФС, протекающие по типу Ib, могут быть внутренним источником $O_2^{\bullet-}$ и, как следствие, АФК, см. Раздел 1.1.2.

Важным фактором, определяющим реакционную способность окисляющих агентов живых клеток, является значение pH среды. Значение pH для хрусталиков здоровых глаз были зарегистрированы для некоторых животных. Было показано, что значения pH находятся на уровне 6.89 для хрусталиков крыс [162] и в диапазоне от 7.02 до 6.81 при измерении pH от периферических клеток к внутренним для хрусталиков лягушек [163]. При этом отмечается, что при повышении кислотности окружающей среды значение pH хрусталика уравновешивается с pH окружающего раствора, чего не наблюдается при снижении кислотности окружающей среды [162]. В нормальных условиях значение pH водянистой влаги (см. Рис. 1.2) находится в узком диапазоне pH от 6.5 до 7.1 [164,165]. Однако при наружном приеме некоторых глазных препаратов pH стекловидной жидкости [166] и водянистой влаги [164] (см. Рис. 1.2) сдвигается в область меньших значений. Снижение pH водянистой влаги наблюдается также при увеличении концентрации CO_2 вследствие ношения контактных линз из полиметилметакрилата [167] и при хирургических глазных операциях с использованием лазерного излучения [165].

Как было упомянуто выше (Раздел 1.1.1), ОС зачастую приводит к ацидозу клеточной среды. Учитывая тот факт, что ОС в том числе является предпосылкой развития катаракты, можно предположить, что данная патология также приводит к смещению pH среды в область низких значений. Однако возрастные и катарактальные изменения pH хрусталика глаза человека в настоящее время остаются неизвестными.

1.4. Фотохимические свойства кинуренинов и продуктов их термического разложения

1.4.1. Фотохимические свойства кинуренинов

На протяжении долгого времени вклад УФ-А излучения в повреждение белков *in vivo* сильно недооценивался, поскольку многими исследователями считалось, что основной вклад в повреждение дает УФ-В излучение, фотоны которого обладают более высокой энергией.

Поглощение излучения аминокислотными остатками TrpH, которые являются самыми эффективными УФ-хромофорами в белках ($\lambda_{max} = 280$ нм, см. Рис. 1.1), долгое время считалось одним из факторов, инициирующих фотоповреждение кристаллинов и способствующих развитию катаракты. Впоследствии на животных моделях было показано, что именно УФ-А, а не УФ-В свет ответственен за развитие катаракты [168]. Данный факт свидетельствует о том, что в поглощении УФ-А излучения хрусталиком участвуют иные хромофоры.

В 70-х годах XX века было показано [169], что хрусталик человека содержит большие количества (0.4-0.6 мМ) [137,140] соединений, поглощающих излучение в диапазоне 315-400 нм. Этими соединениями оказались Куп и его производные – кинуренины. Химическая структура и спектр поглощения Куп в водном растворе приведены на Схеме 1.5 и Рис. 1.3, соответственно. Куп синтезируется в эпителиальных клетках хрусталика из TrpH посредством ферментативных превращений, включающих образование NFK.

При старении организма, и особенно при развитии катаракты, концентрация свободных кинуренинов уменьшается [140,170,171], что характеризуется падением доли поглощения света на 360 нм свободными кинуренинами с 63% в здоровых хрусталиках до 3% в катарактальных хрусталиках [171]. В то же время доля поглощения излучения УФ-А диапазона белковой фракцией увеличивается [159,171,172]. Установлено, что такие возрастные изменения происходят вследствие ковалентного связывания кинуренинов с аминокислотными остатками белков [159,170,173].





Первые фотохимические исследования показали, что кинуренины в водных растворах демонстрируют крайне малые значения квантовых выходов флуоресценции [172] и АФК [174]. Позднее было показано, что они также обладают малым выходом триплетных состояний, $\Phi(^{3}$ Kyn) < 1 % [175,176]. Другими словами, кинуренины эффективно переводят энергию поглощенных фотонов в тепло, не приводя к реакциям фотовозбужденных состояний с

белками. На этом основании кинуренинам была приписана роль молекулярных УФ фильтров хрусталика.

Исследование механизма эффективного перехода возбужденного синглетного состояния Куп (¹Куп) в основное синглетное (Куп) показало, что межмолекулярные водородные связи между ¹Куп и молекулами растворителя играют ключевую роль в безызлучательном переходе ¹Куп \rightarrow Куп [177]. Причиной существенной роли водородных связей в механизме дезактивации ¹Куп является особенность распределения электронной плотности в ¹Куп: при оптическом возбуждении Kyn происходит смещение электронной плотности от -NH₂ группы кольца в сторону атома O>C=O группы (см. Схему 1.5). Этот внутренний перенос заряда (ВПЗ) приводит к увеличению кислотности –NH2 и основности >C=О группы, что в конечном итоге увеличивает способность >C=О группы образовывать водородные связи с молекулами растворителя. Моды валентных колебаний этих водородных связей участвуют в безызлучательном переходе 1 Kyn \rightarrow Kyn, и электронная энергия рассеивается в виде колебательной энергии водородных связей [177]. Интересно отметить, что протонирование – NH₂ группы ¹Куп (рКа=1.5) блокирует ВПЗ, что приводит как к исчезновению полосы поглощения в УФ-А диапазоне, так и к отсутствию миграции электронной плотности на >C=O группу в возбужденном состоянии. В отсутствии ВПЗ скорость внутренней конверсии значительно уменьшается, что приводит к эффективному образованию ³Kyn. В итоге, в водном растворе при pH=0.1 $\Phi({}^{3}$ Kyn) увеличивается почти до 100% [175].

Квантово-химическое исследование безызлучательной конверсии ¹Куп \rightarrow Куп в газовой фазе показало и возможное участие внутримолекулярного переноса электрона и протона (атома водорода) от –NH₂ к >C=O группе [178]. Таким образом, нельзя исключать, что в белковой среде хрусталика существует комбинация внутри- и межмолекулярного процессов дезактивации ¹Куп.

В отсутствие тушителей ³Куп гибнет в реакции триплет-триплетной аннигиляции с константой скорости $k_{\rm T-T} = 4.1 \cdot 10^9 \, {\rm M}^{-1} {\rm c}^{-1}$ [142,174], реакция 1.4.1а.

$${}^{3}\mathrm{Kyn} + {}^{3}\mathrm{Kyn} \to {}^{1}\mathrm{Kyn} + \mathrm{Kyn} \tag{1.4.1a}$$

³Куп реагирует с TrpH и TyrOH (как свободными, так и в составе белка) с образованием свободных радикалов посредством переноса электрона от аминокислоты к ³Куп [68], реакция 1.4.16, с последующим быстрым депротонированием катион-радикалов TrpH^{•+} и TyrOH^{•+}, реакция 1.4.1в. Кислотно-основное равновесие радикалов TrpH и TyrOH будет более подробно рассмотрено в Разделе 1.5.

3
Kyn + TrpH (TyrOH) \rightarrow Kyn^{•-} + TrpH^{•+} (TyrOH^{•+}) (1.4.16)

 $TrpH^{\bullet+} (TyrOH^{\bullet+}) \rightleftarrows Trp^{\bullet} (TyrO^{\bullet}) + H^{+}$ (1.4.1B)

1.4.2. Термическая нестабильность кинуренинов и их фотохимически активные продукты

В физиологических условиях Куп может подвергаться термическому разложению с образованием различных промежуточных и конечных продуктов [175,179,180,181] – вторичных кинуренинов. Важной особенностью первичных кинуренинов является их способность к спонтанному дезаминированию с образованием ненасыщенных карбоксикетоалкенов (carboxyketoalkenes, CKA), см. Схему 1.6 [179]. Последующее ковалентное присоединение СКА в реакции Михаэля к нуклеофильным группам, например, к тиольной группе GSH или аминокислотным остаткам лизина, His и CysSH, приводит к образованию ковалентной сшивки Куп с белками, см. Пример реакции между СКА и GSH на Схеме 1.6. Этот процесс считается нормальной возрастной ПТМ белков хрусталика и обусловливает вышеупомянутое увеличение количества ковалентных сшивок УФ фильтров с белками хрусталика с возрастом.



Схема 1.6. Схема образования ковалентной сшивки между Куп и GSH.

Стоит отметить, что сшивки GSH-Куп в большей степени проявляют свойства фотосенсибилизаторов по сравнению с первичными кинуренинами [175,176,182]. Этот факт объясняется тем, что стерическое затруднение доступа >C=O группы Куп к межмолекулярным водородным связям существенно увеличивает как квантовый выход флуоресценции, так и выход ³Куп [176], что является дополнительным фактором повышения восприимчивости старых хрусталиков к УФ свету и развития возрастной катаракты [176,183,184].

Важно отметить, что некоторые финальные продукты распада кинуренинов являются эффективными ФС с высоким квантовым выходом триплетных состояний, способных реагировать с белками хрусталика. На сегодняшний день известно о двух таких соединениях, 4-гидроксихинолин (4-hydroxyquinoline, 4HQN) и кинуреновая кислота (KNAH[—]), см. Схему синтеза соединений на Схеме 1.7.



Схема 1.7. Схема синтеза фотохимически активных продуктов из Куп.

Кинуреновая кислота имеет три титруемых протона [185] и в нейтральном водном растворе существует в анионной форме, обозначенной как KNAH[—], см. Химическую структуру на Схеме 1.7. Значения квантовых выходов триплетных состояний 4HQN и KNAH[—], $\Phi(^{3}$ 4HQN) и $\Phi(^{3}$ KNAH[—]), в нейтральных водных растворах равны 35% [177] и 82% [185], соответственно, что многократно превышает значение $\Phi(^{3}$ Kyn), равное 0.7 %. Кроме того, константы скорости реакций ³4HQN и ³KNAH[—] с TrpH и TyrOH на порядок превосходят константы скорости для триплетных состояний исходных кинуренинов [24,68,177]. Таким образом, данные продукты распада кинуренинов могут вносить существенный вклад в повреждение белков хрусталика под действием света.

1.4.3. Спектральные и фотохимические свойства кинуреновой кислоты в основном и возбужденном триплетном состоянии

КNАН[—] является наиболее эффективным ФС хрусталика человеческого глаза среди всех хромофоров данной ткани, известных на сегодняшний день. В здоровых хрусталиках человека КNАН[—] была обнаружена в количествах 2-7 нмоль/г [186], что на два порядка ниже, чем суммарная концентрация кинуренинов (400-600 µМ) [137,140]. Однако, принимая во внимание значительно более высокое значение $\Phi({}^{3}KNAH^{-})$, ${}^{3}KNAH^{-}$ может повреждать белки хрусталика глаза с эффективностью, сопоставимой с родительскими кинуренинами. Следует отметить, что содержание KNAH⁻ значительно повышается при прогрессировании катаракты хрусталика человека (до 14 нмоль/г [186]), что усугубляет КNAH--индуцированное фотоповреждение белков с развитием данного заболевания. Высокое значение Ф(³KNAH⁻) предоставляет удобную возможность изучения механизмов окислительнодля восстановительных реакций между возбужденными состояниями биологически значимых хромофоров и биологическими молекулами.

Спектры поглощения кинуреновой кислоты в водных растворах при pH=0.3 (KNAH₂), pH=6.4 (KNAH[—]) и pH=12.6 (KNA^{2—}) приведены на Рис. 1.4. При понижении pH от 6.4 до 0.3 происходит незначительный коротковолновый сдвиг максимума спектра и значительное уменьшение коэффициента поглощения. С помощью спектрофотометрического титрования было получено две константы кислотности KNAH₂: pK_{a1} =2.5 (>C=O⁺H или –COOH группа) и pK_{a2}=11.6 (>NH группа) [185,187].

Предполагается [188], что при нейтральном значении pH триплетное состояние KNAH[—] присутствует в анионной форме аналогично основному состоянию. Спектры промежуточного поглощения кислотно-основных форм ³KNAH[—], полученные с помощью метода лазерного импульсного фотолиза, приведены на Рис. 1.5 (А). Путем измерения pH-зависимости величины промежуточного поглощения ³KNAH[—] на длине волны 600 нм (ΔА₆₀₀) было получено значение

pKa(³KNAH₂) = 3.7 [188]. На данный момент не известно, к какой функциональной группе относится это значение.





Одним из важных вопросов первичной фотохимии KNAH[—] является механизм реакции между ³KNAH[—] и TrpH. Важность этой реакции обусловлена самым высоким значением константы скорости тушения ³KNAH[—], k_q (TrpH) = $(1.5\div3)\cdot10^9$ M⁻¹c⁻¹, по сравнению со значениями, известными для тушения другими ароматическими и серосодержащими аминокислотами и антиоксидантами, см. Таблицу 1.1 [24,188].

Таблица 1.1. Константы скорости тушения (k_q) ³KNAH⁻ при pH 7.3 и pH > 9 и KNAH₂ при pH 3.0 [24,188].

Тушитель	$k_q / 10^8 M^{-1}c^{-1}$			
	pH 3.0	pH 7.3	pH > 9	
TrpH	20 ± 2	24 ± 2	*	
TyrOH	13 ± 1	5.5 ± 0.5	*	
CysSH	< 0.05	0.7 ± 0.1	6.4 ± 0.6 (pH 9.2)	
GSH	< 0.01	0.15 ± 0.08	$6.1 \pm 0.6 \text{ (pH 10.0)}$	
Asc	17 ± 2	15 ± 2	*	
O ₂	25 ± 2	23 ± 2	*	

* - не измерялась

Значение k_q (TrpH) практически не меняется в широком диапазоне значений pH от 3 до 7 [188]. Высокая активность TrpH в реакции тушения ³KNAH[—] сохраняется и в том случае, если остаток TrpH находится в составе белковой глобулы [24,28]. В связи с высоким значением скорости тушения, близкой к диффузионно-контролируемому режиму, в качестве механизма данной реакции был предложен механизм переноса электрона (electron transfer, ET) [24,188] по

аналогии с механизмами ранее изученных реакций между аминокислотами и триплетными состояниями различных ФС, в том числе кинуренинов [68,69,175], реакции 1.4.3a и 1.4.36:

$$^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{TrpH} \rightarrow \text{KNAH}^{\bullet 2-} + \text{TrpH}^{\bullet +}$$
 (1.4.3a)

$$\Gamma r p H^{\bullet +} \rightleftharpoons T r p^{\bullet} + H^{+}$$
(1.4.36)

Тушение ³КNАН[—] приводит к образованию радикала с предположительной формулой КNАН^{•2—} при рН 7. Спектрофотометрическое титрование показало, что данный радикал имеет кислотно-основное равновесие с pKa(KNAH₂^{•—}) = 5.5 [188]. Спектры промежуточного поглощения кислотно-основных форм KNAH^{•2—}/KNAH₂^{•—} приведены на Рис. 1.5 (Б). Следует отметить, что ET-механизм тушения не получил спектроскопического подтверждения из-за большого перекрытия спектров поглощения ³KNAH[—] [185,187], TrpH^{•+}/Trp[•] [65,189,190] (см. Рис. 1.5 (В)) и KNAH^{•2—} [25,188] в области длин волн 400–600 нм, где эти частицы демонстрируют максимумы своих полос поглощения. При этом из литературных данных известно, что реакции тушения триплетных состояний ФС ароматическими аминокислотами могут протекать также по механизмам РСЕТ и переносу атома водорода (hydrogen transfer, HT). Например, механизм РСЕТ был предположен [191] и впоследствии подтвержден [192] для реакции между возбужденным состоянием карбоксибензофенонов и TrpH. В связи с наличием карбонильных и карбоксильных групп в структурах как карбоксибензофенонов, так и KNAH[—], не исключается, что PCET-механизм может иметь место и при протекании реакции между ³KNAH[—] и TrpH.



Рис. 1.5. Спектры (А) промежуточного поглощения ³KNAH₂ при pH 2.8 и ³KNAH⁻ при pH 7.3 (Б) поглощения радикалов KNAH⁻ при pH 3.0 и 7.2 (В) поглощения Trp[•] и TrpH^{•+}.

В отличие от реакции с TrpH, константы скорости реакций ³KNAH[—] с TyrOH и CysSH имеют более низкие значения и проявляют значительную зависимость от pH раствора, см. Таблицу 1.1. Предполагается, что в данном случае дезактивация ³KNAH[—] при разных значениях pH протекает по разным механизмам. Наиболее выраженная pH-зависимость k_q была обнаружена в случае реакции с тиолами CysSH и GSH [188], депротонированные формы

которых ($-S^{-}$) при pH > 9 реагируют с ³KNAH⁻ гораздо быстрее нейтральных форм (-SH). Это явление объясняется переключением механизма реакции с быстрого ET в реакциях $-S^{-}$ на более медленный механизм HT в случае -SH групп тиолов.

Реакция между ³КNAH[—] и O₂ также протекает с высокой константой скорости, $k_q(O_2) = 2.4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ [24,188] при pH 7. Среди продуктов реакции не наблюдается образования какихлибо интермедиатов, поглощающих в диапазоне 300-650 нм [185], при этом образуется ¹O₂ с квантовым выходом около 40% [174], реакция 1.4.3в:

$${}^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{O}_{2} \rightarrow \text{KNAH}^{-} + {}^{1}\text{O}_{2} \tag{1.4.3B}$$

1.4.4. Кинуреновая кислота как компонент антиоксидантной защиты клеток

Помимо термического пути образования KNAH[—] из TrpH, KNAH[—] также может образовываться ферментативно [193], что обусловливает её присутствие в небольших количествах во многих тканях организма человека [194,195,196]. Доминирующее число публикаций о KNAH[—] посвящено ее роли в нейрофизиологических процессах мозга, см. обзорные работы [194,195,197]. Как правило, в данных исследованиях на основе измерения количества KNAH[—] в различных отделах головного мозга проводится корреляция содержания KNAH[—] с развитием той или иной болезни. Было показано, что KNAH[—] играет важную роль при патогенезе болезни Гентингтона [198] и шизофрении [199]. Несмотря на биологическую активность KNAH[—] в нейрофизиологических процессах мозга, точные механизмы её действия остаются неизвестными.

Кроме свойств нейроактивного вещества, KNAH[—] также проявляет способность дезактивировать свободные радикалы организма, т.е. выступать в роли антиоксиданта [200,201,202]. Например, в работах [203] и [200] показано, что присутствие KNAH[—] в реакционной смеси уменьшает количество перекисных модификаций липидов и ДНК, вызванных воздействием OH[•], что доказывает способность KNAH[—] захватывать и дезактивировать свободные радикалы и, соответственно, ингибировать развитие OC. Однако в упомянутых работах, как правило, отсутствуют какие-либо сообщения о возможных механизмах и продуктах реакции KNAH[—] с такими высокореакционными частицами как OH[•], $O_2^{•-}$ и ONOO[—][200,203].

В работе Prasanthkumar и коллег [202] был получен спектр промежуточного поглощения частицы, образующейся в реакции между KNAH[—] и OH[•], характеризующийся двумя полосами поглощения с максимумами на 370 и 470 нм. Квантово-химические расчёты показали, что наиболее вероятная структура образующейся частицы – радикальный аддукт KNAH[—] и OH[•]. Таким образом, не исключается, что антиоксидантная роль KNAH[—] может задействовать участие различных радикальных производных KNAH[—]. Следует отметить, что на данный

момент механизмы окислительно-восстановительных реакций с участием радикалов KNAH[—] изучались в основном только с точки зрения участия KNAH[—] в фотохимических процессах. Однако фотохимическая генерация радикалов KNAH[—] может быть применена и как достаточно удобный способ исследования реакций короткоживущих интермедиатов, возникающих без участия света.

1.5. Механизмы и продукты реакций радикала триптофана в модельных средах

На Схеме 1.8 приведены структуры радикалов Trp' и TyrO'. Квантово-химические расчёты показали, что наиболее высокая спиновая плотность в Trp' локализована на атомах N1 и C3 [204] индольного фрагмента, а радикальный центр в TyrO' примерно с равными вероятностями локализован на атомах C1, C3, C5 ароматической системы и O феноксильной OH-группы [205]. Протонированная форма радикала TyrO', TyrOH⁺⁺, характеризуется крайне низким значением pKa(TyrOH⁺⁺), равным -2 [206], поэтому в водных растворах существует лишь в виде нейтрально заряженного феноксильного радикала. В то же время протонированная форма Trp', TrpH⁺⁺, характеризуется значением pKa(TrpH⁺⁺) = 4.3 [189], что означает присутствие незначительного количества катион-радикала TrpH⁺⁺ даже в средах со слабокислым значением pH. Химические структуры TrpH⁺⁺ и TyrOH⁺⁺ приведены на Схеме 1.8.



Схема 1.8. Кислотно-основные формы радикалов TrpH и TyrOH.

1.5.1. Внутримолекулярный перенос электрона в цепи аминокислотных остатков триптофана и тирозина

Высокая окислительно-восстановительная активность TrpH и TyrOH обусловливает лёгкий перенос электрона с данных аминокислотных остатков на радикальные центры, первоначально образующиеся на других аминокислотных остатках белка [207,208,209,210]. Таким образом, первоначальное повреждение удаленных сайтов в белковой цепи может быть перенесено на остатки TrpH и TyrOH, что увеличивает степень их повреждения, даже если TrpH и TyrOH присутствуют в небольшом количестве или скрыты внутри белковой структуры. Кроме того, показано, что остатки TrpH в белке могут быть окислены и радикалами других биомолекул, таких как основания ДНК [211].

Внутримолекулярная цепь переноса электрона может включать в себя несколько аминокислотных остатков TrpH и TyrOH. Свойство Trp' и TyrO' быть посредниками в цепи

внутримолекулярного переноса электрона на большие расстояния имеет ключевое значение в механизмах функционирования некоторых ферментов [212,213,214]. Трансформация Trp[•] → TyrO[•] является важным этапом в каталитических механизмах множества ферментов, регулирующих окислительно-восстановительные реакции, таких как цитохром с пероксидаза [215], ДНК-фотолиаза [216], галактозидаза [217], а также описана для Trp[•] в составе HEWL [218,219] и модельных пептидов, состоящих из пары TrpH/TyrOH, разделенной пептидным мостиком [220].

Реакции переноса электрона от аминокислотных остатков ТугОН к радикалу триптофана внутри белковых молекул протекают с константами скорости 10^2-10^4 с⁻¹, и их скорость зависит от множества факторов, включая расстояние между остатками аминокислот, структуру белка и его конформацию [210,220,221]. При этом следует отметить, что зачастую процесс Trp' \rightarrow TyrO' не является необратимым, при этом равновесие Trp' \rightleftharpoons TyrO' зависит от структуры белка [210,220,221]. Константа скорости процесса Trp' \rightarrow TyrO' для HEWL сравнительно невысока, k(Trp' \rightarrow TyrO') = 130 с⁻¹ при pH 7.0 [219]. Интересно отметить, что k(Trp' \rightarrow TyrO') зависит от pH. Так, для HEWL было показано, что уменьшение pH раствора влияет на скорость процесса Trp' \rightarrow TyrO' вследствие (1) изменения конформации белка в результате протонирования остатка глутамина 35, а также (2) протонирования Trp' в составе белка с образованием TrpH'+ [208]. Последний фактор обусловлен различием значений окислительновосстановительных потенциалов пар Trp'/TrpH и TrpH'+/TrpH: E(Trp'/TrpH) = 1.02 В и E(TrpH'+/TrpH) = 1.11 В, соответственно [222]. Как результат, катион-радикал TrpH'+ способен окислять TyrOH быстрее Trp', что обусловливает резкое увеличение k (Trp' \rightarrow TyrO') до 2100 с⁻¹ при понижении pH раствора от 7.0 до 5.4 [208].

1.5.2. Образование кросс-сшивок между остатками триптофана

Как для аминокислоты TrpH [25,106], так и для TrpH-содержащих белков [24,26,27,28,77,223] было обнаружено, что основными продуктами реакций Trp' в анаэробных условиях являются различные внутри- (в случае белков) и межмолекулярные ковалентные кросс-сшивки Trp-Trp [28,106,79]. Как было отмечено ранее, за счет делокализации электронов по пиррольному и бензольному кольцам Trp', а также возможности образования хиральных атомов углерода, продукты Trp' представляют сложную смесь регио- и стереоизомеров Trp-Trp. Стоит отметить, что образование кросс-сшивок не происходит в реакциях Trp'/TyrO' с основными состояниями как алифатических, так и ароматических аминокислотных остатков.

Димеризация двух радикалов с образованием новой ковалентной связи, как правило, является очень быстрым процессом из-за низких энергетических барьеров для таких реакций. Реакция димеризации Trp[•] представляют собой кинетически-контролируемую реакцию с константами скорости для разных производных TrpH (k_d) в диапазоне (2–6)·10⁸ M⁻¹c⁻¹
[75,76,106]. При этом показано, что значения k_d уменьшаются с увеличением заряда и молекулярной массы TrpH-содержащих пептидов [106]. Димеризация Trp' в составе белков зависит от стерических факторов. Например, при обработке белка фибронектина окисляющим агентом, ONOO[—], значения выходов и характер образующихся межбелковых кросс-сшивок Trp-Trp зависят от того, в какой из двух конформаций находится белок – компактной или развернутой [108]. При этом отмечается, что если компактная конформация фибронектина благоприятствует комбинации Trp' с образованием кросс-сшивок Trp-Trp, то развернутая конформация благоприятствует другим путям модификаций, включая образование 6-нитро-TrpH [108].

В большинстве модельных биологических систем кросс-сшивки с участием TrpH и ТуrOH являются конечными продуктами модификации [224]. Однако показано, что в условиях длительного воздействия окислительного повреждения возможно дальнейшее окисление этих первичных продуктов в процессе последующего одноэлектронного окисления кросс-сшивок с образованием свободных радикалов. Так, было показано, что ковалентное сшивание трёх остатков TrpH обнаруживается для СОД при использовании CO_3 ⁻⁻ в качестве источника свободных радикалов [73], а также при УФ-А фотолизе смеси свободного TrpH с рибофлавином [26] или KNAH⁻⁻ [25].

Так как некоторые живые ткани организмов характеризуются низкими концентрациями O_2 в диапазоне 3–70 мкМ [225] и крайне низкими < 2 мкМ в случае хрусталика человека [161], то гипотетически образовавшийся Trp[•] в составе белков, вероятно, гибнет в реакциях переноса электрона от соседних остатков TrpH или TyrOH или в реакциях рекомбинации с другими радикалами. Данный факт повышает значимость быстрых реакций димеризации двух радикалов *in vivo*, поэтому исследование механизмов формирования кросс-сшивок проводится в анаэробных условиях с пониженной концентрацией O_2 .

Фотосенсибилизированное образование кросс-сшивок Trp-Trp

.

На примере УФ-А фотосенсибилизированного фотолиза N-ацетил-триптофана (NTrpH) в присутствии KNAH[—] в водном растворе с нейтральным значением pH было показано, что в растворе протекают следующие реакции:

$${}^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{NTrpH} \rightarrow \text{KNAH}^{\bullet 2-} + \text{NTrp}^{\bullet} + \text{H}^{+}$$
(1.5.2a)

$$KNAH^{\bullet 2-} + NTrp^{\bullet} + H^{+} \rightarrow KNAH^{-} + NTrpH$$
(1.5.26)

$$KNAH^{*2-} + KNAH^{*2-} \rightarrow 1, 4-DHQ, 4HQN, ddOKNA1, ddOKNA2$$
(1.5.2B)

$$NTrp' + NTrp' \rightarrow NTrp-NTrp$$
(1.5.2r)

В анаэробных условиях, $C(O_2) < 15$ мкМ, основной результат повреждения NTrpH в свободном состоянии реализуется по типу фотореакций Ia, т.е. без вклада реакций с участием 1O_2 или O_2 ···. Квантовый выход продуктов деградации NTrp-NTrp (Φ_{deg}) в данном случае невелик, Φ_{deg} (NTrp) = 19 %, по причине эффективного восстановления исходных реагентов – NTrpH и KNAH⁻⁻ в реакции ОПЭ, реакция 1.5.26. Оценка константы скорости данного процесса дала значение, близкое к $3 \cdot 10^9$ M⁻¹c⁻¹ [25]. Стоит отметить, что фотосенсибилизированное анаэробное повреждение TrpH в присутствии рибофлавина также было ограничено эффективной реакцией ОПЭ между Trp[•] и анион-радикалом рибофлавина [26].

Основными продуктами деградации NTrpH являются кросс-сшивки NTrp-NTrp, образующиеся в реакции 1.5.2г. При этом было показано, что KNAH[—]-сенсибилизированный анаэробный фотолиз белков HEWL [28] и α-кристаллина [24], выделенного из хрусталика бычьего глаза, также приводит к образованию Trp-содержащих кросс-сшивок в качестве основных продуктов деградации белков.

Помимо кросс-сшивок в реакционных смесях после фотолиза NTrpH и белков были обнаружены следующие продукты KNAH[—] с потерей атома кислорода: 4HQN, 1,4-дигидро-2-карбоксихинолин (1,4-DHQ), 2,2'-(1,2-дигидроэтан-1,2-диил)дихинолин-4(1H)-он (ddOKNA1), 4,4'-би(1,4-дигидро-2-карбоксихинолин) (ddOKNA2), см. химические структуры продуктов на Схеме 1.7 и 1.9 [25,28].



Схема 1.9. Продукты фотохимической деградации КNАН-.

Стоит подчеркнуть, что вышеописанная схема реакций была исследована только для водных растворов при нейтральном значении pH, наиболее близком к pH здоровой ткани хрусталика глаза. Однако смещение pH в сторону низких значений, имеющее место, например, при ацидозе тканей при развитии OC, может изменять механизмы описанных радикальных реакций. Причиной такого изменения может быть отличие химических свойств различных кислотно-основных форм радикалов. Так, не исключается, что протонированная форма радикала KNAH^{*2—}, KNAH^{2^{*—}} (см. Раздел 1.4.3), может иметь химические свойства, отличные от KNAH^{*2—}, и тем самым изменять механизмы и константы скорости реакций (1.5.26, 1.5.2в), приводя к изменению степени или характера повреждений TrpH. По этой же причине радикальные механизмы повреждения TrpH могут изменяться в случае, если кислотно-основные формы Trp^{*+} имеют различные химические свойства по отношению к

КNАН^{•2—}/КNАН₂^{•—} и Trp[•]/TrpH^{•+}. Данное различие можно предположить, основываясь на различии значений E(Trp[•]/TrpH) и E(TrpH^{•+}/TrpH) [222].

1.5.3. Образование оксигенированных форм триптофана

Реакция с молекулярным кислородом

Большинство углерод-центрированных радикалов (R^{*}), образованных из боковых цепей алифатических аминокислот в результате реакций отщепления атомов водорода, реагируют с O_2 с высокими константами скорости (k ~ $10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$), образуя пероксильные радикалы (ROO^{*}) [13]. Особенностью же радикалов ароматических аминокислот являются их заметно более низкие константы скорости реакций с O_2 : k(Trp^{*} + O_2) < $10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [75] и k(TyrO^{*} + O_2) < $10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [226]. Было показано, что в результате данных реакций не образуется O_2^{*-} , что исключает механизм ЕТ для данных реакций и предполагает образование TrpOO^{*} [227], реакция 1.5.3а.

$$Trp^{\bullet} + O_2 \rightarrow TrpOO^{\bullet}$$
(1.5.3a)

Вопрос о том, по какому положению Trp[•] присоединяется O_2 с образованием аддукта TrpOO[•], изучен не до конца. Некоторые исследователи предполагают, что присоединение происходит преимущественно по атому C3 Trp[•] [228] в соответствии с высокой спиновой плотностью в этом положении, установленной с помощью квантово-химических расчетов [204]. В то же время существуют и исследования, опровергающие присоединение O_2 по данному положению [227].

Дальнейшие реакции TrpOO[•] являются малоизученными. Известно, что органические пероксильные радикалы могут вступать в многочисленные реакции [13]. В биологических системах с высокими концентрациями соединений, от которых ROO[•] может отщеплять электрон и впоследствии подвергаться протонированию, основными продуктами являются гидропероксиды (ROOH).

Реакция с супероксид-анионом

Реакция между радикалами Trp[•] и O_2^{--} является одной из фундаментально важных реакций, которая может протекать во внутриклеточном метаболизме многих тканей. Одним из факторов, обусловливающих её важность, является высокая константа скорости данной реакции, равная $1.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ [75]. Исследователи радикальных реакций, использующие различные методы генерации свободных радикалов, сходятся во мнении, что данная реакция при определенных условиях может быть основным источником оксигенированных продуктов TrpH. Однако в настоящее время в научной литературе существует противоречивая информация о выходе оксигенированных продуктов TrpH в реакции между Trp[•] и O_2^{--} .

Фотохимический метод генерации свободных радикалов аминокислот и O_2^{-} может быть использован в условиях, при которых фотоповреждение аминокислот протекает по механизму 1b, см. Раздел 1.1.2. Например, показано, что свободные радикалы таких природных фотосенсибилизаторов как KNAH⁻⁻, рибофлавин и птерин, образующиеся в реакции тушения триплетных состояний аминокислотными остатками белков, в т.ч. ТгрH, легко окисляются молекулярным кислородом раствора [25,26,229].

На примере фотолиза NTrpH в присутствии KNAH[—] было показано, что источник оксигенирования NTrpH определяется, прежде всего, соотношением концентраций NTrpH и O₂ в растворе. В случае высоких C(O₂) фотоповреждение NTrpH протекает по типу II, т.е. через образование ¹O₂ [25]. Однако в случае очень низких C(O₂) основным источником оксигенирования NTrpH становится реакция Trp[•] и O₂^{•—}, тип фотореакций Ib. Высокий выход O₂^{•—} в данном случае обусловлен высокой константой скорости реакции 1.5.36, близкой к диффузионной, k = $2 \cdot 10^9$ M⁻¹c⁻¹ [25].

$$KNAH^{\bullet 2-} + O_2 \rightarrow KNAH^- + O_2^{\bullet -}$$
(1.5.36)

Таким образом, быстрая реакция 1.5.3б эффективно подавляет конкурирующую реакцию между радикалами аминокислоты и фотосенсибилизатора, 1.5.2б. На основании того факта, что в подобных условиях Φ_{deg} для TrpH [229], его производных [25], а также аминокислотного остатка TrpH в составе белка [28] имеют очень низкие значения, $\Phi_{deg} < 5\%$, был сделан вывод, что реакция 1.5.3в

$$Trp^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow TrpH + O_2 \tag{1.5.3B}$$

протекает преимущественно по механизму ЕТ от $O_2^{\bullet-}$ к Trp[•] с восстановлением исходных соединений и с крайне малым выходом оксигенированных продуктов TrpH. Кроме того, показано, что снижение стационарной концентрации $O_2^{\bullet-}$ при фотолизе 5-гидрокситриптофана, 5OH-TrpH, в присутствии птеринов путем добавления в реакционную смесь СОД увеличивает значение $\Phi_{deg}(5OH-TrpH)$ [230]. Стоит отметить, что сравнение значений E^o($O_2^{\bullet-}/O_2$) = 0.33 B [54] и E^o(TrpH/Trp[•]) = 1.02 В также говорит в пользу высокой вероятности восстановления исходных соединений в реакции 1.5.3в [222].

Важно отметить, что, поскольку константы скорости процессов 1.5.26, 1.5.2г и 1.5.3в близки, то имеет место значительная конкуренция этих процессов за Trp[•]. Как следствие, даже сравнительно небольшие изменения в значениях констант скорости данных реакций в результате изменения условий в растворе (ионная сила, pH, белковое окружение и т.д.) могут приводить к значительным изменениям в характере итоговых повреждений TrpH. Ранее этот эффект был продемонстрирован на примере образования продуктов оксигенирования и димеров ТугOH в реакциях ТугO[•] [231]. Не исключается, что в случае нахождения Trp[•] в составе

белковой глобулы скорость и продукты радикальных реакций могут существенно зависеть не только от стерических затруднений, но и от кулоновских эффектов, обусловленных распределением заряда по поверхности белковой глобулы, которые могут увеличивать или уменьшать доступность различных аминокислотных остатков для реагентов, тем самым, значительно влияя на эффективность каналов различных бимолекулярных реакций.

Исследования реакции между Trp[•] и $O_2^{•-}$ с помощью другого метода генерации радикалов – импульсного радиолиза – свидетельствуют о том, что данная реакция, напротив, протекает со 100% выходом продуктов ковалентного связывания $O_2^{•-}$ с Trp[•] [75,232], реакция 1.5.3.г.

$$Trp^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H^+ \to TrpOOH \tag{1.5.3r}$$

Данный вывод был сделан на основе оценок радиолитического выхода разложения TrpH, близкого к 100 % [75,232], и обнаружения среди продуктов радиолиза гидропероксидов TrpH [232], количества которых были близки к количеству распавшегося TrpH. Стоит отметить, что ковалентное связывание $O_2^{\bullet-}$ наблюдается и для реакции с TyrO[•], несмотря на тот факт, что реакция переноса электрона с восстановлением ТуrOH также термодинамически возможна, $E(TyrOH/TyrO^{\bullet}) = 0.93$ В. Данная реакция также протекает с высокой константой скорости $\approx 1.5 \cdot 10^9$ M⁻¹c⁻¹ и приводит к необратимому повреждению аминокислотного остатка TyrOH [75,233,234]. Таким образом, существующее противоречие указывает на то, что реакция между $O_2^{\bullet-}$ и Trp[•] может протекать в несколько стадий или конкурировать с иными, неизвестными на сегодняшний день радикальными процессами, ранее не принимаемыми во внимание.

В исследованиях с использованием как фотохимической генерации O₂⁻⁻ и Trp⁺, так и импульсного радиолиза, среди продуктов оксигенирования TrpH и его производных были обнаружены NFK, Kyn, гидропероксиды TrpH с брутто-формулой TrpH(+2O), а также продукт их восстановления, 2-карбокси-3α-гидроксипирролоиндол (HPI) [25,75,232]. Химические структуры производных данных соединений, обнаруженные для NTrpH [25] и N-ацетил-О-метил-триптофана (NTrpHOMe) [75] приведены на Схеме 1.10. Для NTrpH в работе [25] был также обнаружен N-ацетил-OIA, см. химическую структуру OIA на Схеме 1.5. Оксигенированные формы TrpH(+2O) были отнесены к гидропероксидам со структурой N-ацетил-Зα-гидропероксипирролоиндола (N-ацетил-HPPI) [235] на основании сходств их оптических спектров с литературными данными, см. Схему 1.10.



Схема 1.10. Химические структуры продуктов оксигенирования NTrpH и NTrpHOMe.

Предполагается, что образующийся в ходе радиолиза ТгрООН, реакция 1.5.3г, представляет собой два стереиозмера – продукта присоединения O_2 к Trp[•] по положению C3 (гидропероксид TrpH, TrpOOH). Данный короткоживущий интермедиат далее замыкается (1) с образованием диоксетана (гипотетический интермедиат) или (2) в конкурирующей реакции атаки нуклеофильной группы –NH₂ по положению C2 с образованием двух стереизомеров более долгоживущего гидропероксида NHPPI (обнаружены экспериментально). Химические структуры соединений приведены на Схеме 1.11. Диоксетан TrpH в свою очередь может разлагаться с раскрытием цикла с образованием NFK. Интересно отметить, что близкие соотношения финальных продуктов деградации, NHPPI и NFK, были также обнаружены среди продуктов реакции $^{1}O_2$ с TrpH [236]. Данный факт позволяет предположить, что реакция между $^{1}O_2$ и TrpH приводит к образованию того же короткоживущего интермедиата TrpOOH, образование которого предполагается и для реакции между Trp[•] и O₂^{•—}.





При комнатной температуре NFK постепенно подвергается гидролизу с образованием Kyn [75]. Относительно стабильные органические гидропероксиды HPPI также разлагаются при их выдерживании при комнатной температуре с образованием NFK [64,75,237], Kyn, спиртов и диолов [236,237,238]. Известно, что при восстановлении ионами металлов органические

42

гидропероксиды могут являться источниками алкоксильных (RO[•]), алкильных (R[•]) и пероксильных радикалов (ROO[•]), которые инициируют дальнейшее повреждение аминокислотных остатков белков [13,236,239]. Таким образом, идентификация NHPPI *in vivo* может быть затруднена по причине нестабильности данных соединений в тканях или в процессе пробоподготовки и анализа. При этом не исключается, что гидропероксиды NHPPI могут играть важную роль интермедиатов в процессе накопления ПТМ белковых молекул *in vivo*.

Описанные механизмы образования оксигенированных форм TrpH, по-видимому, имеют место и при образовании оксигенированных форм кросс-сшивок Trp-Trp, которые были найдены в небольших количествах среди продуктов фотосенсибилизированного фотолиза TrpH [25,26].

1.5.4. Образование ковалентных сшивок триптофана с молекулами фотосенсибилизаторов

Особенностью фотосенсибилизированного фотолиза ТгрН и ТгрН-содержащих белков является образование ковалентных сшивок между молекулами ФС и остатками ТгрН. Например, такие сшивки были обнаружены в составе продуктов фотолиза триптофана в присутствии KNAH[—] [25] и рибофлавина [26,240,241], а также белка лизоцима в присутствии KNAH[—] [28] и Rose Bengal [27]. Кроме того, сообщается, что ТгрН в составе белка под действием УФ излучения может образовывать схожие ковалентные сшивки с ДНК в процессе радикальных реакций. Показано, что данная модификация обладает мутагенной активностью [242].

Интересно отметить, что выход сшивок между TrpH и KNAH[—] значительно возрастает в случае, когда TrpH находится в составе белка, как это было показано на примере фотосенсибилизированного фотолиза лизоцима [28], а также в случае проведения фотолиза свободного NTrpH в растворах с повышенной вязкостью (10–40 сПз) [243]. Ковалентный характер связи между ФС и TrpH в составе данных продуктов позволяет предполагать радикальный механизм образования подобных сшивок.

Наиболее простым механизмом образования сшивки между TrpH и KNAH[—] могла бы служить комбинация радикалов KNAH^{•2—} и Trp[•], протекающая как побочный процесс наряду с реакцией восстановления 1.5.26. Однако брутто-формула нейтрально заряженного продукта сшивания, KNAH-Trp, установленная с помощью масс-спектрометрического анализа, свидетельствует потере фрагментом KNAH[—] двух атомов H в составе сшивки [25]. Спонтанный отрыв H₂ от гипотетического продукта соединения KNAH^{•2—} и Trp[•] рассматривается как маловероятный процесс. Более вероятный механизм, соответствующий образованию KNAH-Trp, мог бы включать образование радикальной формы KNA^{•-}, соответствующей отрыву атома H от KNAH[—], с последующей реакцией с радикалом Tpn, см. Схему 1.12.

В настоящее время реакции, приводящие к образованию KNA[•] в фотохимических системах, где KNAH[—] выступает в роли ФС, неизвестны. Наиболее простым методом генерации KNA[•] могла бы быть реакция с высокореакционным радикалом HO[•], однако, как было отмечено выше (Раздел 1.4.4), данная реакция приводит к образованию радикального аддукта, а не отщеплению атома H от ароматической системы KNAH[—].



KNA[●][₽]

Схема 1.12. Предполагаемый путь образования ковалентной сшивки КNAH-Trp.

Не исключается, что подобные ковалентные сшивки между ТгрН и ФС могут быть естественными ПТМ белков в хрусталике человеческого глаза. В этом случае, наряду с связанными с белками И кинуренинами, ковалентно значительно усиливающими фотосенсибилизирующую способность Куп (см. Раздел 1.4.2), данные ПТМ могут ускорять дальнейшее повреждение белка. Фотохимические свойства сшивок TrpH с KNAH-, как в свободном состоянии, так и в белках, в настоящее время неизвестны. Понимание механизмов их образования в модельных системах могло бы помочь в увеличении выхода данных продуктов для последующего выделения и анализа фотофизических и фотохимических свойств данных соединений. Кроме того, знания о механизмах образования данных сшивок позволили бы ответить на вопрос о возможном образовании данных продуктов *in vivo*.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Используемые реагенты

В работе были использованы коммерчески доступные соединения без дополнительной очистки: кинуреновая кислота (KNAH[—]), L-триптофан (LTrpH), N-ацетил-L-триптофан (NTrpH), метиловый эфир N-ацетил-L-триптофана (NTrpHOMe) и N-ацетил-тирозин (NTyrOH), суспензия культуры клеток *Micrococcus lysodeikticus* («Sigma-Aldrich», CША), лизоцим белка куриного яйца (Hen Egg White Lysozyme, HEWL) («Helicon», Россия). Дейтерированная вода (D₂O) была от «Астрахим», Россия.

Буферный раствор (PBS, pH 7.3) фосфатов натрия был приготовлен с использованием дистиллированной деионизованной воды (18.2 МОм) и солей КСl, NaCl, Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄ («AppliChem», Германия). Для ферментативного гидролиза HEWL использовался раствор трисаминометана (Tris) («BioRad Laboratories», CША), для проведения гель-электрофореза HEWL был приготовлен буферный раствор гидрокарбоната аммония («ДИА-М», Россия). После разведения солей растворы дополнительно были очищены с помощью бумажных фильтров Whatman 1001-055 («Whatman plc», Великобритания) с диаметром пор 11 мкм. pH образцов изменяли добавлением растворов HCl и NaOH («Sigma-Aldrich», CША). Измерение pH растворов осуществлялось с помощью стеклянного электрода InLabMicro («MettlerToledo», Швейцария) на pH-метре PP-15 «Sartorius» (Германия). Калибровка pH-метра проводилась по набору стандарт-титров образцов буферных растворов (ГОСТ 8.135).

Для проведения электрофореза использовались: додецилсульфат натрия (SDS), тетраметилэтилендиамин (TEMED), персульфат аммония («Helicon», Россия), трис(гидроксиметил)аминометан, β-меркаптоэтанол, дитиотреитол («Bio-RaD», США). Массстандарты для электрофореза («Fermentas», Литва) были использованы без дополнительной очистки. Для проведения трипсинолиза HEWL и последующего масс-спектрометрического анализа был использован трипсин («Promega», США).

Ацетонитрил (ACN) («Криохром», Россия), муравьиная (НСООН) и уксусная (CH₃COOH) кислоты хроматографической чистоты («Sigma-Aldrich», США) использовались без предварительной очистки. Вода для всех экспериментов была дистиллирована и деионизирована (18.2 МОм).

2.2. Оптическая спектроскопия

Стационарные спектры поглощения были зарегистрированы при помощи спектрофотометра Agilent 8453 («Hewlett-Packard», США). Для измерений использовалась прямоугольная кварцевая кювета с сечением в основании 10×10 или 10×2 мм. Для всех экспериментов по KNAH[—]-сенсибилизированному фотолизу аминокислот и HEWL оптическая

плотность приготовленных образцов на длине волны 355 нм (A₃₅₅) составляла около 0.9 для оптического пути 1 см, что учитывалось при расчете квантового выхода фотодеградации реагентов.

2.3. Лазерный импульсный фотолиз

Кинетические кривые и спектры промежуточного поглощения (Transient Absorption, TA) были получены с использованием установки лазерного импульсного фотолиза. Схема установки представлена на Рис. 2.1.



Рис. 2.1. Схема установки лазерного импульсного фотолиза.

Раствор, помещенный в прямоугольную кварцевую кювету 10×8 мм, облучали с помощью Nd³⁺:YAG лазера Quanta-Ray LAB-130-10 («Spectra-Physics», CША): длина волны 355 нм; энергия в импульсе до 135 мДж; длительность импульса 8 нс, частота 10 Гц, диаметр лазерного пучка 7 мм. Луч лазера направлялся на кювету с помощью кварцевой призмы. Небольшая часть лазерного луча (примерно 1.5%) отводилась кварцевой пластинкой и направлялась на фотодиод для синхронизации запуска осциллографа и измерения энергии импульса лазера с помощью измерителя мощности излучения 1918-С («Newport», США). Система регистрации состоит из дуговой ксеноновой лампы ДКсШ-150 (длительность импульса 2 мс, размер регистрирующего луча 1×3 мм), монохроматора Model 78025 («Newport», США, 200-1000 нм, 1нм/дел), фотоумножителя 9794В («Electron Tubes Ltd», Великобритания), цифрового двухканального осциллографа 104МХі («LeCroy», CША) и системы фильтров, линз и шторок. Во всех экспериментах длина пути оптического возбуждения составляла 1 мм, а длина пути детектирования 7 мм. Установка полностью управляется персональным компьютером.

2.4. Стационарный фотолиз

Стационарный фотолиз образцов проводили с помощью ртутной лампой высокого давления ДРШ-1000. ИК диапазон излучения лампы отсекался с помощью водного фильтра, а необходимая спектральная область (355-380 нм) выделялась с помощью набора стеклянных УФ-фильтров (УФС-6 и БС-7). Фотолиз растворов (3 мл) проводился в кварцевой кювете 10×8 мм. Площадь падающего светового пучка составляла около 0.7 см². Согласно результатам актинометрии, проведенной по стандартной методике с использованием водного раствора ферриоксалата калия [244], интенсивность излучения в выбранном диапазоне длин волн (355-380 нм) составила (2.64 ± 0.3)·10¹⁷ квантов·с⁻¹·см⁻².

2.5. Импульсный фотолиз

Импульсный фотолиз исследуемых образцов проводился с использованием Nd³⁺:YAG лазера в качестве источника излучения. Использовалась установка, приведенная на Рис. 2.1, без использования оборудования для детектирования зондирующего луча. Облучение образцов проводилось лазерными импульсами частотой 10 Гц и энергией 3-6 мДж/импульс. В процессе фотолиза через определенные интервалы времени после начала облучения отбирались пробы объемом 50 µл, которые далее были проанализированы методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с оптическим (ВЭЖХ-УФ) и/или масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ-МС).

2.6. Высокоэффективная жидкостная хроматография с оптическим детектированием (ВЭЖХ-УФ)

Хроматографический анализ был проведен жидкостным хроматографом Agilent 1100 Series LC с детектором на основе фотодиодной линейки. Пробы, отобранные во время фотолиза образцов, разбавлялись в соотношении 40 µл образца к 600 µл дистиллированной деионизованной воды. Для разделения и количественного анализа продуктов фотолиза производных аминокислоты TrpH, NTyrOH и KNAH[—] анализ смесей проводился на колонке Agilent Zorbax Eclipse Rapid Resolution XBD-C18 (4.6×100 мм, 80 Å, 1.8 µм) со скоростью потока 0.5 мл/мин, с использованием градиента двух жидких фаз (A) воды и (Б) ACN с присутствием 0.1 % муравьиной кислоты в каждой фазе. Был использован следующий градиент фазы Б: 0% (0-5 мин), 0-35% (5-20 мин), 35-80% (20-30 мин), 80-100% (30-31 мин), 100% (31-15мин), 100-0% (35-36 мин). Образцы вводили в хроматограф использованием автоматической роботизированной системы, термостатированной при 4 ° С. Объём вводимой пробы составлял 80 µл. Оптическое детектирование проводили с использованием детектора с диодной матрицей (DAD) на длинах волн 240, 280, 316, 330 и 400 нм. Обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения Agilent Chem Station. Изменение количества исходных реагентов оценивали исходя из изменения площади пиков в хроматограммах, зарегистрированных на длинах волн, соответствующих максимуму поглощения соединений, и соответствующих значений коэффициентов экстинкции (ε_λ): ε₂₈₀=5600 M⁻¹cm⁻¹ для TrpH [65] и ε₃₃₂=9800M⁻¹cm⁻¹ для KNAH⁻⁻ [185].

Концентрации продуктов были определены с использованием соответствующих коэффициентов поглощения, взятых из литературных данных. Для продуктов KNAH⁻⁻: $\epsilon_{316}(4HQN)=1.5\cdot10^4$ M⁻¹cm⁻¹ [177], $\epsilon_{316}(1,4\text{-DHQ}) = 6.3\cdot10^3$ M⁻¹cm⁻¹ (использованы данные для близкого по структуре 2-гидроксихинолина, [245]), $\epsilon_{316}(ddO\text{-KNA1}) = 3.0\cdot10^4$ M⁻¹cm⁻¹ и $\epsilon_{316}(ddO\text{-KNA2}) = 12.6\cdot10^3$ M⁻¹cm⁻¹ (соединения были приняты как димеры 4HQN и 1,4-DHQ, соответственно). Значения ϵ_{280} (димерыTrpH) были оценены как удвоенный коэффициент поглощения TrpH, 2·5.6·10³ M⁻¹cm⁻¹. Для оксигенированных форм TrpH были взяты следующие значения: ϵ_{240} (NOIA) = 6.2·10³ M⁻¹cm⁻¹ [246], ϵ_{235} (NHPI) = 6.3·10³ M⁻¹cm⁻¹ [247], ϵ_{240} (NNFK) = 1.0·10⁴ M⁻¹cm⁻¹ [248] и ϵ_{235} (NHPI) = 6.6·10³ M⁻¹cm⁻¹ [235].

2.7. Расчёт квантовых выходов фоторазложения исходных реагентов

Квантовые выходы разложения (Φ_{deg}) KNAH[—] и производных TrpH были определены по начальным линейным участкам графиков зависимости концентрации реагентов от времени облучения. При расчете было принято, что свет поглощается только KNAH[—].

1. Для случая импульсного фотолиза значение Φ_{deg} рассчитывалось следующим образом:

$$\Phi_{\rm deg} = N_{\rm deg} / N_{\rm abs} \cdot 100 \% \tag{2.1}$$

где N_{deg} – количество распавшихся молекул реагента, рассчитанное по формуле (2.2), а N_{abs} – количество квантов света, поглощенных KNAH⁻⁻, за время облучения *t*.

$$N_{deg} = \Delta C \cdot V \cdot N_A \tag{2.2}$$

где ΔC – изменение концентрации реагента [M] за время облучения (*t*), V – объём облучаемого раствора [л], N_A – число Авогадро (6.02×10²³ моль⁻¹).

Значение N_{abs} за время облучения *t* было рассчитано по формуле 2.3:

$$N_{abs} = N_q \cdot t \cdot (1 - 10^{-A})$$
(2.3)

где N_q – количество квантов света в секунду [квант·с⁻¹], падающее на кювету с образцом, рассчитанное по формуле 2.4, t – время облучения [c], (1-10^{-A}) – доля падающего света, поглощенная KNAH[—], A – оптическое поглощение образца на длине волны 355 нм, измеренное с помощью спектрофотометра Agilent 8453 («Hewlett-Packard», США).

$$N_{q} = E \cdot \lambda \cdot \nu / h \cdot c \tag{2.4}$$

где Е – энергия лазерного импульса (Дж), λ – длина волны возбуждения (355·нм), ν – частота излучения (10 Гц), h – постоянная Планка (6.63·10⁻³⁴ Дж·с) и с – скорость света (3·10⁸ м/с).

2. Для случая стационарного фотолиза значение Φ_{deg} рассчитывалось с помощью формул 2.1-2.3, с использованием формулы (2.5) для расчёта интенсивности падающего света (N_q) от лампы ДРШ-1000 (см. Раздел 2.4):

$$N_{q} = 2.64 \cdot 10^{17} \text{ квант} \cdot \text{c}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot 0.7 \text{ cm}^{2} = 1.84 \cdot 10^{17} \text{ квант} \cdot \text{c}^{-1}$$
(2.5)

2.8. Анализ ферментативной активности лизоцима

Ферментативную активность HEWL определяли путем количественной оценки скорости лизиса клеток *Micrococcus lysodeikticus* методом измерения светорассеяния суспензии клеток, ранее описанным в работе Ibrahim и коллег [249]. Измерение светорассеяния на 450 нм (A₄₅₀) производилось с помощью спектрофотометра Agilent 8453 («Hewlett-Packard», CША). Скорость уменьшения зачения A₄₅₀ для клеточной суспензии (170 мкг сухих клеток/мл) измерялась в растворе 1.9 мл PBS (50 мМ, pH 6.2) после добавления 100 мкл растворов, содержащих 20, 40, 60 и 80 мкг/мл HEWL до и после УФ-А фотолиза HEWL при различныхзначениях pH. Регистрация A₄₅₀ проводилась в течение 120 с после добавления раствора HEWL с временным интервалом регистрации точек 2 с. Для качественного сравнения ферментативной активности исходного и поврежденного HEWL были ипользованы растворы HEWL, выдержанные несколько часов без УФ-А облучения при барботировании растворов аргоном.

2.9. Ферментативный гидролиз HEWL

Для проведения ферментативного гидролиза исходного и модифицированного HEWL трипсином (0.2 мкг/образец) 3 мкл образца растворяли в 75 мкл буферного раствора гидрокарбоната аммония (100 мМ) и выдерживали в течение 4 часов при 37 °C согласно стандартной методике [250]. Полученные пептиды анализировали с помощью ВЭЖХ-УФ-МС анализа.

2.10. Масс-спектрометрия

Для анализа степени деградации исходных реагентов, а также идентификации продуктов фотолиза использовался масс-спектрометр Bruker Daltonics Maxis 4G («Bruker Daltonics», Германия) с электроспрейной ионизацией и квадрупольным времяпролетным анализатором, сопряженным с высокоэффективным жидкостным хроматографом UltiMate 3000 RS (Dionex, Германия) с детектором на основе фотодиодной линейки. Система UltiMate 3000RS оснащена тройным насосом, термостатированной автоматической системой подачи образцов и проточной ячейкой для оптических измерений в диапазоне 190-800 нм. Температура в автоматической системе подачи образцов поддерживалась на уровне 4 $^{\circ}$ С.

Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке Agilent Zorbax 300 SB-C18 (1.0×150 мм, 300 Å, 3.5 мкм) с использованием градиента двух жидких фаз – (А) воды и (Б) ACN с присутствием 0.1 % муравьиной кислоты в каждой фазе; скорость потока 150 мкл/мин. Хроматографическое разделение малых молекул описано в Разделе 2.6. HEWL и его продукты были разделены при использовании следующего градиента фазы Б: 5% (0-4 мин), 5%-30% (4-10 мин), 30%-45% (10-45 мин), 45%-95% (45-46 мин), 95% (46-50 мин), 95%-5% (50-51 мин) и 5% (51-65 мин). Для разделения пептидов, полученных при ферментативном гидролизе HEWL и его продуктов, использовали следующий градиент фазы Б: 5% (0-5 мин), 5%-60% (5-45 мин), 60%-95% (45-46 мин), 95% (46-50 мин), 95%-5% (50-51 мин) и 5% (51-65 мин). Массспектрометрический анализ был осуществлен в условиях, детально описанных в работе Sherin и коллег [24]. Масс-спектры были зарегистрированы в положительном режиме в диапазоне m/z 300-2900 для HEWL и его пептидов и 50-600 для малых молекул – продуктов фотолиза KNAH и аминокислот. Были установлены следующие параметры прибора: напряжение на торцевой пластине смещения – 500 В; напряжение на капилляре – 4200 В; давление распылителя – 1 бар; скорость потока осушающего газа - 8 л/мин; температура осушающего газа - 200°С. В начале хроматографического анализа каждого образца на вход масс-спектрометра подавался калибровочный раствор для контроля параметров прибора и для посткалибровки данных, если это необходимо. Для HEWL использовали калибровочный раствор ESI-TuneMix низкой концентрации («Agilent Technologies», США), а для пептидов и малых молекул – калибровочный раствор кластеров формиата натрия. МС спектры отражали интенсивности ионов; точность определения массы ± 0,001 Да. Анализ данных выполнялся с использованием программного обеспечения Data Analysis 4.0 (Build 275, Bruker Daltonics). Количественный анализ проводился на основании данных оптической спектроскопии, тогда как качественный анализ и определение химического состава соединений производилось на основе данных массспектрометрии. Структура ряда модифицированных пептидов HEWL была установлена с помощью тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), при которой фрагментация пептида столкновительной диссоциации молекул (Collision осуществлялась методом Induced Dissociation, CID).

2.11. Гель-электрофорез

Для определения молекулярных масс продуктов после фотолиза KNAH[—] и HEWL был произведен одномерный электрофорез в полиакриламидном геле 10×10 см (15%-ПААГ) в присутствии SDS по методу Лэммли [251]. Непосредственно перед нанесением на гель к образцам HEWL, отобранным во время фотолиза, добавлялся раствор 31 мМ Tris, содержащий 1% SDS и 2.5% β-меркаптоэтанола, затем образцы выдерживались в течение 5 минут при 95°С.

После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue R-250 в 10% уксусной кислоте. Изображения гелей были получены с использованием VersaDoc 4000 MP Imaging System (Bio-Rad, США). Приблизительные молекулярные массы продуктов были определены с использованием белковых маркеров.

Для определения количества димеров HEWL был использован денситометрический анализ интенсивностей полос с использованием программного обеспечения BioRad Image Lab. Общая интенсивность всей полосы на дорожке была принята равной 100% и соответствовала концентрации белка в исходных растворах. Концентрации мономеров и димеров HEWL были оценены с учетом процентного вклада отдельных полос в каждой дорожке.

ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ МЕЖДУ ТРИПЛЕТНЫМ СОСТОЯНИЕМ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И АМИНОКИСЛОТОЙ ТРИПТОФАН

Настоящая глава работы направлена на детальное изучение механизма реакции триплетного состояния KNAH⁻⁻ (³KNAH⁻⁻) с TrpH, наиболее эффективным тушителем ³KNAH⁻⁻ среди ароматических и серосодержащих аминокислот (Таблица 1.1, Раздел 1.4.3), методом наносекундного лазерного импульсного фотолиза. Предыдущие исследования предполагали ET как механизм реакции, однако данный механизм не получил прямого спектроскопического подтверждения.

Реакции между триплетными состояниями фотосенсибилизаторов и ТгрН могут протекать по механизмам ЕТ или РСЕТ/НТ от ТгрН к триплетному состоянию ФС (см. Раздел 1.4.3), приводя к образованию протонированного радикала ТгрН⁺⁺ или нейтрального радикала Тгр[•], соответственно. Данные частицы можно отличить по спектрам поглощения, характеризующимися максимумами полос поглощения на 510 нм для Тгр[•] и 570 нм для ТгрН⁺⁺ [65,190]. Обнаружение той или иной частицы с помощью регистрации спектров промежуточного поглощения (Transient Absorption, TA) могло бы дать основание для установления того или иного механизма тушения. Однако сильное перекрытие спектров поглощения образующихся частиц (см. Рис. 1.5), являющееся типичным явлением в оптических экспериментах, может затруднять установление механизма реакции.

В данной работе образование определённой формы радикала TrpH как непосредственного продукта тушения было установлено с помощью варьирования pH раствора. Принцип такого установления механизма тушения состоит в том, что в случае, если форма радикала, образующаяся непосредственно в процессе тушения, не соответствует равновесной форме для выбранного pH раствора, кинетика сигнала TA будет отражать процесс достижения термодинамического равновесия.

3.1. Выбор экспериментальных условий

Для регистрации кинетики радикалов TrpH при различных значениях pH необходимо убедиться в выполнении двух требований: (1) эффективность образования радикалов не должна существенно зависеть от pH и (2) вклад других частиц, образующихся в реакции тушения, в наблюдаемый сигнал TA должен быть минимизирован для спектрального диапазона 450–600 нм, где радикалы TrpH обладают наибольшим поглощением.

Учитывая первое требование, следует отметить, что KNAH[—] существует в анионной форме (см. химическую структуру на Схеме 1.7 Раздела 1.4.2) в широком диапазоне pH между двумя значениями pKa: 2.5 и 11.6 [185,187]. Триплетное состояние, ³KNAH[—], имеет значение pKa(³KNAH₂) = 3.7 [188]. Предполагается, что данная частица сохраняет анионную форму ³KNAH[—] при нейтральном значении pH. Несмотря на тот факт, что значения E^o отличаются для

пар TrpH/Trp[•] и TrpH/TrpH^{•+} (см. Раздел 1.5.1), TrpH реагирует с обеими формами ,³KNAH[—] и ³KNAH₂, практически с одинаковой константой скорости как при pH > pKa(TrpH^{•+}) = 4.3, так и при pH < 4.3, см. Таблицу 1.1 Раздела 1.4.3. Таким образом, в диапазоне pH 3–8 эффективность оптического возбуждения ³KNAH₂[—] и его последующей реакции с TrpH практически нечувствительна к изменению кислотности среды.

Второе требование важно для изучаемой реакции, поскольку радикал KNAH-, образующийся в реакции тушения, имеет спектр поглощения с максимумами на 370 и 520 нм при нейтральном значении pH, а также широкую полосу без четкого максимума в диапазоне 380–500 нм в условиях pH < 5.5 [188], см. Рис. 1.5 (Б). Данный факт приводит к существенному перекрытию спектров поглощения радикалов KNAH⁻⁻ и Trp⁺/TrpH⁺⁺ в используемом диапазоне рН. Для быстрого удаления радикалов KNAH[—] из растворов все эксперименты были проведены в аэробных условиях. Молекулярный кислород быстро окисляет как протонированные (при рН < 5.5), так и депротонированные радикалы KNAH⁻⁻ (при pH > 5.5) с константой скорости $2.0 \cdot 10^9$ $M^{-1}c^{-1}$ с образованием KNAH⁻ в основном состоянии и супероксид-аниона, $O_2^{\bullet-}$, см. реакцию 1.5.36. Реакция Trp' с O₂ неэффективна по причине низкой константы скорости, $k < 10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Барботирование водных растворов кислородом поддерживает C(O₂) на уровне 1.4 мМ при комнатной температуре [252], что приводит к исчезновению радикалов KNAH⁻ из раствора менее чем за 0.3 мкс. Образующийся O2[•] и его протонированная форма, HO2[•], характеризуются спектрами поглощения в глубокой УФ области с максимумом на 240 нм [38]. Таким образом, оптическое возбуждение КNAH[—] в присутствии высокой концентрации TrpH в аэробных условиях обеспечивает регистрацию Trp' в спектральном диапазоне 450-600 нм при pH 3–8 с незначительным вкладом поглощения других частиц, присутствующих в растворе.

3.2. Установление механизма реакции между ³KNAH⁻ и TrpH

В случае, если реакция между ³KNAH⁻ и TrpH протекает по механизму ET, непосредственными продуктами реакции являются частицы KNAH^{•2-} и TrpH^{•+}, реакция 3.1. В условиях нейтрального pH радикал TrpH^{•+} быстро депротонируется с образованием нейтрального радикала Trp[•], реакция 3.2:

$${}^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{TrpH} \rightarrow \text{KNAH}^{\bullet 2-} + \text{TrpH}^{\bullet +}$$

$$TrpH^{\bullet +} \rightarrow \text{Trp}^{\bullet} + H^{+}$$

$$(3.1)$$

$$(3.2)$$

Здесь и далее в тексте настоящей работы обозначение TrpH будет использоваться для описания общих свойств, характерных для всех производных триптофана. Для обозначения конкретных соединений, использованных в экспериментах, а именно, L-триптофана, N-ацетил-L-триптофана и N-ацетил-О-метил-триптофана, будут использованы обозначения LTrpH, NTrpH и NTrpHOMe, соответственно.

На Рис. 3.1 (A) показаны кинетические кривые TA, зарегистрированные на длине волны 580 нм после облучения буферных растворов 0.3 мМ KNAH[—] и 10 мМ NTrpH лазерным импульсом (355 нм) в аэробных условиях при различных значениях pH раствора. Быстрый спад сигнала TA в течение первых 80 нс после лазерного импульса отражает гибель ³KNAH[—] в реакции с NTrpH. Участок кинетической кривой с более медленным спадом сигнала TA при pH 7.5, наблюдаемый в течение первой микросекунды после импульса, соответствует окислению KNAH^{•2—} кислородом; скорость спада данного сигнала уменьшается с уменьшением C(O₂) в растворе (данные не приведены). Спад долгоживущего сигнала TA, интенсивность которого возрастает по мере увеличения доли TrpH^{•+} в растворе, обусловлен гибелью радикалов TrpH в реакции димеризации, реакция 3.3, и реакции с O₂^{•—}, реакции 3.4 и 3.5:

$$\Gamma r p^{\bullet} + T r p^{\bullet} \rightarrow T r p - T r p \tag{3.3}$$

$$Trp^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow TrpH + O_2$$
(3.4)





Рисунок 3.1. Кинетические кривые TA, зарегистрированные на длине волны 580 нм после облучения образца, содержащего 0.3 мМ КNAH⁻⁻, лазерным импульсом (355 нм, 13 мДж) при (A) C(NTrpH) = 10 мМ и различных значениях pH при барботировании раствора кислородом; (Б) различных C(NTrpH) при pH 4.2 и барботировании раствора кислородом; (B) C(NTrpH) = 10 мМ и pH 4.2 при барботировании раствора аргоном, воздухом и кислородом.

Следует подчеркнуть, что при нейтральном значении pH (Рис. 3.1(A)) кинетические кривые TA не отражают динамики депротонирования TrpH^{•+}, что можно было бы ожидать из механизма ET, реакции 3.1 и 3.2. Напротив, по мере снижения pH кинетические кривые TA демонстрируют рост сигнала во временном диапазоне 0.2–0.7 мкс после поглощения лазерного импульса. Данная особенность кинетических кривых свидетельствует о трансформации частиц, образующихся в результате тушения ³KNAH[—]. Простейшим объяснением такой динамики сигналов TA может быть наблюдение процесса протонирования Trp[•] с образованием TrpH^{•+} при $pH \le pKa(TrpH^{•+}) = 4.3$.

Альтернативные объяснения наблюдаемого роста сигнала ТА на 580 нм могут включать (а) фотоионизацию ³KNAH⁻ и захват образовавшегося e⁻_{solv} триптофаном с образованием электронного аддукта TrpH^{•—} или (б) реакцию KNAH^{•2—} и/или Trp[•] с O₂ с образованием пероксильных радикалов KNAHOO^{•2—} и/или TrpOO[•]. Для проверки присутствия вероятных альтернативных механизмов были проведены следующие эксперименты. Во-первых, были зарегистрированы кинетические кривые TA при pH 4.2 с изменением концентрации TrpH, см. Puc. 3.1 (Б). В случае фотоионизации скорость захвата сольватированных электронов TrpH должна линейно возрастать с увеличением концентрации TrpH. Однако зарегистрированные кинетические кривые не выявили каких-либо видимых изменений в эволюции сигнала TA при изменении концентрации TrpH, что опровергает вклад фотоионизации в наблюдаемый рост сигнала.

Для проверки второй гипотезы были зарегистрированы кинетические кривые ТА при pH 4.2 с изменением C(O₂) путем барботирования через раствор аргона, воздуха или кислорода. В случае вклада поглощения пероксильных радикалов в наблюдаемый рост сигнала TA, скорость данного роста должна увеличиваться с увеличением C(O₂). Полученные данные (Рис. 3.1 (В)) показывают, что присутствие кислорода не меняет скорость роста сигнала TA, но уменьшает амплитуду этого сигнала. Последнее обусловлено уменьшением общего количества образующихся радикалов за счет частичного тушения ³KNAH[—] кислородом на первичной стадии фотолиза. Таким образом, наблюдаемый рост сигнала TA не обусловлен образованием пероксильных радикалов, поглощающих на длине волны 580 нм.

Следует отметить, что скорость роста сигнала ТА заметно увеличивается при понижении pH (Рис. 3.1 (A)), незначительно увеличивается с увеличением концентрации PBS (Рис. ПЗ.1 (A) Приложения 1) и не зависит от исходной концентрации образующихся радикалов (Рис. ПЗ.1 (Б) Приложения 1). Данный факт указывает на то, что образование частиц, ответственных за рост поглощения на 580 нм, происходит в pH-зависимой реакции, при этом скорость их образования растёт с увеличением концентрации H⁺ в растворе и не зависит от реакций между радикалами. Данные характеристики процесса хорошо согласуются с образованием Trp⁺, а не TrpH⁺⁺ в реакции тушения 3.1 и с наблюдением последующего протонирования Trp⁺ при pH < pKa (TrpH⁺⁺).

Дальнейшее подтверждение предложенного механизма было получено из анализа эволюции спектров ТА. На Рис. 3.2 (А) представлены спектры ТА, зарегистрированные после лазерного облучения растворов, содержащих 0.3 мМ КNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH, pH 4.2, при барботировании аргоном. Данный эксперимент проводился в анаэробных условиях, поскольку наиболее выраженный эффект протонирования Trp[•] наблюдался в отсутствие кислорода, см. Рис. 3.1 (В). Спектр ТА, наблюдаемый сразу после поглощения лазерного импульса, представляет собой суперпозицию спектров поглощения ³KNAH[—] (положительный сигнал ТА, полоса поглощения с максимумом на 580 нм) и выгорания основного состояния KNAH[—]

(отрицательный сигнал TA, полоса с максимумом на 330 нм). Быстрое тушение ³KNAH[—] в течение первых 80 нс после поглощения лазерного импульса приводит к образованию радикалов KNAH[—] и TrpH, суммарное поглощение которых характеризуется широкой полосой в спектре TA с максимумом на 510 нм (синяя линия на Puc. 3.2 (A)). В течение следующих 0.4 мкс максимум данной полосы смещается на 570 нм (красная линия на Puc. 3.2 (A)), после чего амплитуда сигнала TA монотонно уменьшается без изменений в форме спектра на микросекундной шкале. Изменение формы спектра после первоначального образования радикалов можно дополнительно проиллюстрировать разностным спектром, представленным на Puc. 3.2 (Б), который отражает разницу между спектрами TA, зарегистрированными через 0.1 и 0.5 мкс после лазерного импульса (синяя и красная линии, соответственно). Разностный спектр демонстрирует исчезновение полосы TA с максимумом на 510 нм, принадлежащей протонированной форме TrpH^{*+}. Таким образом, полученные спектроскопические данные однозначно подтверждают, что реакция ³KNAH[—] и TrpH приводит к образованию Trp⁺, который затем подвергается протонированию с образование TrpH^{*+} при pH < pKa(TrpH^{*+}).



Рис. 3.2 (А) Спектры ТА, зарегистрированные при различных временных задержках после облучения лазерным импульсом (355 нм, 13 мДж) раствора, содержащего 0.3 мМ КNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH, при pH 4.2, при барботировании раствора аргоном. (Б) Разностный спектр, полученный путем вычитания из спектра ТА, зарегистрированного через 100 нс после лазерного импульса (синяя линия на Рис. 3.2 (А)), спектра ТА, зарегистрированного через 490 нс после лазерного импульса (красная линия на Рис. 3.2 (А)).

Данные, полученные с помощью спектров TA, свидетельствуют о том, что реакция между 3 KNAH[—] и TrpH происходит не по механизму ET, а в процессе, конечным результатом которого является перенос атома водорода. Последний процесс включает два возможных механизма реакции: перенос атома H от TrpH к 3 KNAH[—], механизм HT, реакция 3.6, или последовательный перенос электрона и протона, PCET, реакция 3.7:

$$^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{TrpH} \rightarrow \text{KNAH}_{2}^{\bullet-} + \text{Trp}^{\bullet}$$
(3.6)

$${}^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{TrpH} \rightarrow \text{KNAH}^{\bullet 2-} + \text{TrpH}^{\bullet +} \rightarrow \text{KNAH}_{2}^{\bullet -} + \text{Trp}^{\bullet}$$
(3.7)

Данные механизмы можно отличить путем измерения значения Кинетического Изотопного Эффекта (КИЭ) для бимолекулярной константы скорости реакции (k_q), КИЭ = $k_q(H_2O)/k_q(D_2O)$. Поскольку туннелирование протонов гораздо более чувствительно к расстоянию между донором и акцептором, чем туннелирование электронов, из-за большей массы первых, замена нормальной воды на дейтерированную должна существенно изменять значение k_q , если перенос протона участвует в первичной стадии реакции тушения [253,254,255]. Реакции переноса электрона обычно характеризуются низкими значениями КИЭ в диапазоне 1–1.5 [253,256,257], тогда как для реакций переноса атома водорода ожидаемые значения КИЭ превышают фактор 2 [254,255,257,258].

Для установления значения КИЭ исследуемой реакции была зарегистрирована кинетическая кривая ТА на 580 нм (максимум поглощения ³KNAH⁻, см. Рис. 1.5 (A)) в небуферных растворах KNAH⁻ и TrpH в H₂O и D₂O при pH 3 и 7. Полученные зависимости псевдомономолекулярной константы скорости гибели ³KNAH⁻ ($k_{obs} = k_0 + k_q \times C(TrpH)$) пропорциональны значению C(TrpH) как в нормальной, так и в тяжелой воде (Рис. ПЗ.2 Приложения 1). Линейная аппроксимация зависимости k_{obs} от C(TrpH) (Рис. ПЗ.2 Приложения 1) дала значения k_q представленные в Таблице 3.1. Полученные значения k_q в H₂O ниже, чем сообщалось в [24,188], поскольку измерения в настоящей работе проводили в небуферных водных растворах. Хотя некоторое увеличение абсолютных значений k_q наблюдается при низком значении pH как в H₂O, так и в D₂O, КИЭ практически не зависит от pH и имеет значение 1.3. Низкое значение КИЭ для растворов как с pH 7, так и 3 указывает на то, что механизм реакции между ³KNAH⁻ и TrpH включает перенос электрона в качестве первичного этапа, за которым следует перенос протона внутри радикальной клетки в качестве заключительного этапа реакции тушения (РСЕТ-механизм).

Таблица 3.1. Константы скорости реакции, k_q , между ³КNАН[—] и NTrpH (k_q) в небуферных растворах H₂O и D₂O и значения КИЭ при pH 3 и 7.

рН	$k_q(H_2O)/10^9 M^{-1}c^{-1}$	$k_q(D_2O)/10^9 M^{-1}c^{-1}$	КИЭ
3	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.3
7	1.2 ± 0.2	0.93 ± 0.02	1.3

Следует отметить, что вывод о РСЕТ-механизме реакции основан на предположении, что перенос протона на втором этапе реакции происходит от атома N индольного фрагмента TrpH, поскольку это единственный атом, протон которого в тяжелой воде может быть заменен на дейтерий в обменных процессах. Данное предположение основано на том факте, что энтальпия диссоциации связи N-H в индоле и родственной ему молекуле пиррола значительно ниже, чем энтальпия диссоциации связи С–H [259]. Таким образом, весьма вероятно, что перенос как электрона, так и протона происходит от индольного атома N триптофана.

Дополнительным косвенным подтверждением РСЕТ-механизма является высокое значение константы скорости, k_q. Как было показано ранее [69,258], реакции между триплетными состояниями фотосенсибилизатора и ароматическими аминокислотами протекают по механизму ЕТ с константами скорости (1-3)×10⁹ М⁻¹с⁻¹, тогда как значения k_q для реакций HT существенно меньше и, как правило [69,258], находятся в пределах (3-8)×10⁸ M⁻¹c⁻¹. Данный феномен можно проиллюстрировать на примере реакции между ³KNAH⁻ и аминокислотой ТугОН. Как было упомянуто в Разделе 1.4.3 Главы 1, значение k_q данной реакции в нейтральных (pH 7) водных растворах составляет величину $(5.5 \pm 0.5) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$, что попадает в диапазон значений, характерных для механизма НТ. Следует также напомнить, что значение k_q для этой реакции возрастает почти в два раза при pH 3, $k_q = (13 \pm 1) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$, что может указывать на изменение механизма тушения с НТ при нейтральном рН на ЕТ при низком рН. Подтверждение этого предположения можно получить с помощью измерения значения КИЭ для реакции между ³КNАН⁻ и аминокислотой ТугОН, что было сделано по вышеописанной процедуре. Полученные данные представлены на Рис. ПЗ.З (А) Приложения 1, а значения КИЭ приведены в Таблице 3.2. Как можно видеть, значение КИЭ существенно меняется от 3.3 при pH 7 до 1.5 при pH 3, что подтверждает (a) НТ механизм тушения в нейтральном водном растворе и (б) смену механизма тушения с НТ на ЕТ/РСЕТ при изменении pH с 7 до 3 и (в) высокие значения k_q для констант скорости тушения триплетных состояний ФС ароматическими аминокислотами в водных растворах по механизму ЕТ/РСЕТ. Следует отметить, что НТ и ЕТ/РСЕТ механизмы тушения при рН 7 и 3, соответственно, были подтверждены в работе по исследованию данной реакции методом химически индуцированной поляризации ядер (ХПЯ) [260].

Таблица 3.2	. Константы	скорости	реакции, ка	, между	³ KNAH	и NTyrOH	(kq) в	небуферных
растворах H_2	Ои D ₂ Оизн	ачения КИ	ІЭ при рН 3	и 7.				

pH	$k_q(H_2O)/10^8 M^{-1}c^{-1}$	$k_q(D_2O)/10^8 M^{-1}c^{-1}$	КИЭ
3	7.6 ± 1.2	5.2 ± 0.2	1.5
7	4.0 ± 0.8	1.2 ± 0.2	3.3

Следует отметить, что опубликованные исследования механизмов РСЕТ реакций между ТгрН и триплетными состояниями фотосенсибилизаторов [253,255,257], показывают, что электрон и протон в данных процессах переносятся в разных направлениях: электрон перемещается между реагентами, а протон переносится в объем растворителя (вода). Вариант РСЕТ-механизма, обнаруженный в данной работе, является примером переноса обеих частиц, как электронов, так и протонов, в одном направлении – от ТгрН к ³KNAH[—]. Насколько известно автору настоящей работы, данный случай является первым описанным случаем РСЕТ- механизма, в котором протон от TrpH^{•+} переносится непосредственно к радикалу фотосенсибилизатора.

Для проверки влияния заряда аминокислотного остова на образование нейтральных радикалов Trp[•] были проведены дополнительные эксперименты с LTrp и NTrpOHMe; экспериментальные кинетические кривые TA представлены на Puc. ПЗ.4 Приложения 1. При pH 7 аминокислотный остов LTrpH является цвиттер-ионом, NTrpH – анионом, а NTrpHOMe не обладает электрическим зарядом. Сравнение кинетических кривых TA при pH 4.2 (Puc. 3.3 (A)) показывает, что заряд на N- и C-концах аминокислотного остова не влияет на образование нейтрального Trp[•]. Менее выраженный эффект протонирования Trp[•] в случае NTrpHOMe обусловлен использованием низкой концентрации реагента, C(NTrpHOMe) = 2 мM, вследствие его пониженной растворимости в водном растворе, что приводит к более медленной скорости гибели ³KNAH[—] и, как следствие, меньшему выходу Trp[•] в присутствии O₂.



Рис. 3.3. (А) Кинетические кривые ТА, зарегистрированные после облучения лазерным импульсом (355 нм, 13 мДж) растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 10 мМ LTrpH (черный), 10 мМ NTrpH (синий) и 2 мМ NTrpHOMe (красный) при рН 4.2 и при барботировании растворов кислородом. (Б) Зависимости значений ∆А₅₈₀ через 4 мкс после поглощения лазерного импульса от рН; соответствующие кинетические кривые представлены на Рис. 3.1 (А) и ПЗ.4. Гладкие кривые соответствуют аппроксимации экспериментальных кривых в приближении существования одного значения рК_а.

На сегодняшний день в литературных источниках отсутствуют данные о значениях рКа катион-радикалов TrpH⁺⁺ с различными заместителями в пептидном остове, измеренные непосредственно с помощью оптических методов. Исключением является хорошо известное значение pK_a = 4.3 для LTrpH^{•+} [189]. Данные ТА для различных производных TrpH, полученные в настоящей работе, дают возможность восполнить пробел в недостающих знаниях. Зависимости сигнала ТА через 4 мкс после лазерного импульса от рН (Рис. 3.3 (Б)) теоретическими были аппроксимированы кривыми титрования В предположении существования одного значения pK_a; наилучшее соответствие дали расчётные кривые со значением pKa 4.3, 4.8 и 4.7 для LTrpH, NTrpH и NTrpHOMe соответственно. Отличное согласие вновь полученных и ранее опубликованных [189] данных для радикала LTrpH⁺⁺

подтверждает правильность использованного подхода. Значения pK_a для радикалов NTrpH^{•+} и NTrpHOMe^{•+} согласуются с ранее предсказанным увеличением значений pK_a для остатков TrpH в составе пептидов [222].

Полученные данные показывают, что введение заместителя в N-конец аминокислотного остова TrpH приводит к увеличению значения pKa(TrpH^{•+}) с 4.3 для LTrpH до 4.8 и 4.7 для NTrpH и NTrpHOMe соответственно, тогда как введение заместителя в C-конец имеет незначительное влияние на pKa(TrpH^{•+}). Данный факт указывает (1) на незначительную роль карбоксильной группы –COO[—] в стабилизации нейтрального радикала Trp[•] и (2) на важную роль –NH₃⁺ группы аминокислотного остова.

Ранее сообщалось, что наличие –NH3⁺ группы в структуре LTrpH обусловливает эффективную дезактивацию синглетного возбужденного состояния молекулы за счет внутримолекулярного переноса атома Н от протонированной аминогруппы к индольному [189,190,261]. кольцу Данный факт позволяет предположить существование внутримолекулярной Н-связи между протонированной аминогруппой и индольным кольцом как в синглетном возбужденном состоянии LTrpH, так и в случае радикала LTrp. Предполагается, что именно эта внутримолекулярная Н-связь ответственна за понижение значения pK_a (LTrpH^{•+}). Вероятно, подобные внутримолекулярные взаимодействия Н-связей внутри белковой глобулы могут быть ответственны за дальнейшее снижение значения рК_а индолильных радикалов, как это было обнаружено для TrpH⁺⁺ в составе лизоцима белка куриного яйца, значения pK_a которого составляет 3.1 [223].

Заключение по материалам главы 3

Кинетические и спектральные данные TA, полученные в данной главе, свидетельствуют об образовании радикалов Trp[•] непосредственно в реакции ³KNAH[—] и TrpH, что указывает либо на HT, либо на PCET в качестве механизма реакции. Высокая константа скорости тушения, k_q, и низкое значение кинетического изотопного эффекта, k_q(H₂O)/k_q(D₂O) = 1.3, говорит в пользу PCET-механизма, включающего быстрый перенос электрона в качестве первой стадии и перенос протона в радикальной клетке в качестве конечного шага.

При низких значениях pH образующийся анион-радикал KNAH₂⁻⁻ подвергается протонированию с образованием нейтрального радикала KNAH₃[•] (pKa(KNAH₃[•]) = 5.5 [188]), что следует учитывать в дальнейших исследованиях механизмов радикальных реакций между ³KNAH⁻⁻ и белками. Другим важным следствием PCET-механизма является непосредственное образование нейтрального радикала Trp[•] в результате тушения, что имеет два важных биологических последствия. Во-первых, данный механизм не допускает образования заряженных промежуточных продуктов в белковой среде, характеризующейся низкой диэлектрической проницаемостью. Во-вторых, как было отмечено ранее, нейтральный радикал

Trp[•] в меньшей степени проявляет свойства окислителя по сравнению с TrpH^{•+} [262]. Таким образом, непосредственные продукты реакции ³KNAH[—] и TrpH можно рассматривать как менее опасные интермедиаты радикальных реакций в случае их образования в белковой среде. Ещё одним результатом является определение значений pK_a для TrpH^{•+} с различными заместителями в аминокислотном остове: 4.3, 4.8 и 4.7 для L-триптофана (LTrpH), N-ацетил-L-триптофана (NTrpH) и N-ацетил-C-метил-L-триптофана (NTrpHOMe), соответственно.

Полученные результаты показывают, что измерение величины КИЭ может являться надежным методом по установлению механизмов реакций между фотосенсибилизаторами и ароматическими аминокислотами в водных растворах, как это было показано в случае реакции между ³KNAH[—] и аминокислотами ТуrOH и TrpH.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ _рн на механизмы и продукты Фотоиндуцированных реакций между кинуреновой кислотой и аминоксилотами триптофан и тирозин в свободном состоянии

Свободные радикалы, образующиеся в реакции ³KNAH[—] и ТгрН, обладают кислотноосновным равновесием в области рН ниже физиологических значений \approx 7. Известно, что ОС, являющийся предпосылкой многих заболеваний, может сопровождаться ацидозом – снижением рН внутриклеточной среды. Не исключается что протонирование радикалов KNAH₂^{•—} в растворах с pH < 6 [188] может изменять исход радикальных реакций повреждения белков, ранее изученных для растворов с нейтральным значением pH \approx 7 [25,28]. В настоящей главе описаны результаты исследования влияния pH на KNAH[—]-фотоиндуцированное повреждение ТгрН в свободном состоянии.

Стоит отметить, что Trp' также имеет кислотно-основное равновесие и подвергается протонированию с образованием TrpH^{•+} (см. значения pK_a для катион-радикалов с различными заместителями в Главе 3). Для более надёжного отнесения наблюдаемых pH-эффектов к свойствам того или иного радикала, в данном блоке работы были также проведены эксперименты с N-ацетил-ТуrOH и несколькими производными TrpH. Радикал ТуrOH^{•+} имеет крайне низкое значение pKa = -2 [206], что обусловливает присутствие лишь одной кислотно-основной формы, ТуrO[•] (см. Схему 1.8) в широком диапазоне pH 0–12.

4.1. Выбор экспериментальных условий

Как было показано в Главе 3, введение заместителей в N- и C-концы пептидного остова TrpH приводит к повышению $pK_a(TrpH^{+})$. Учитывая тот факт, что в составе белковой цепи N- и C-концы TrpH также имеют заместители, производные TrpH следует рассматривать как более близкие модели остатков TrpH внутри белковой глобулы. Для надёжного установления pHэффектов, связанных с радикалами TrpH, были использованы три производных данной аминокислоты – LTrpH, NTrpH и NTrpHOMe, значения $pK_a(TrpH^{+})$ которых равны 4.3, 4.8 и 4.7 соответственно. Все эксперименты проводились в водных растворах со значениями pH в диапазоне 3.2-7.4, соответствующим трем различным парам кислотно-основных форм радикалов KNAH[—] и TrpH, см. Схему 4.1:

- (1) KNAH₃• / TrpH•+ при pH 3.2;
- (2) KNAH₃[•] / Trp[•] при pH 4.9;
- (3) KNAH₂•⁻⁻ / Trp• при pH. 7.4.

При pH 4.9 реакционную способность KNAH₃[•] по отношению к Trp[•] невозможно установить без частичного влияния TrpH^{•+}, что особенно выражено в случае NTrpH и NTrpHOMe. Чтобы

избежать неоднозначности в интерпретации результатов, дополнительные эксперименты были проведены при pH 5.5. В данном случае доминирующей формой радикала TrpH является Trp[•], при этом кислотно-основные формы KNAH₂^{•—} и KNAH₃[•] присутствуют в равных количествах.



Схема 4.1. Радикалы кинуреновой кислоты, производных TrpH и NTyrOH при различных значениях pH. Протонированные формы представлены на красном фоне, а нейтральные – на синем. С целью визуализации содержания различных радикальных форм при различных pH, на верхнем ряду (шкала условная) приведены значения pH, используемые в экспериментах, pH 3.2, 4.9, 5.5 и 7.4.

Таким образом, в случае существования различий в реакционной способности KNAH₂[•]- и KNAH₃[•] по отношению к Trp[•], разница в характере деградации реагентов и образовании продуктов фотолиза будет наблюдаться не только при сравнении результатов для pH 7.4 и 4.9, но также и при сравнении результатов для pH 7.4 и 5.5.

В разделе 3.1 Главы 3 было показано, что KNAH[—]-фотосенсибилизированный фотолиз TrpH в диапазоне pH 3-8 происходит как с одинаковым квантовым выходом ³KNAH[—], так и одинаковой эффективностью образования радикалов в реакции между ³KNAH[—] и TrpH. Однако значение k_q в случае NTyrOH, использованного в данной работе в качестве производного TyrOH, увеличивается в два раза, с $8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ до $1.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ при снижении pH от 7 до 3 [188]. Чтобы минимизировать различие в эффективности генерации радикалов TrpH и NTyrOH, эксперименты с NTyrOH проводились при повышенной концентрации аминокислоты (4 мM), что обеспечивает такие же скорости реакции NTyrOH с ³KNAH[—] при pH 7, как и в случае реакции ³KNAH[—] с TrpH. Таким образом, эффективная генерация радикалов всех аминокислот в диапазоне pH 3–8 дает возможность изучить влияние pH на механизмы радикальных реакций

путем анализа деградации исходных реагентов и накопления продуктов. Все эксперименты проводились в анаэробных условиях с незначительным влиянием остаточного кислорода [25].

4.2. Распад реагентов при УФ-А-сенсибилизированном фотолизе

Образцы, содержащие 0.3 мМ КNAH⁻ и 4.0 мМ NTyrOH при pH 3.0, 4.6 и 7.0 или 0.3 мМ КNAH⁻ и 1.0 мМ ТгрН при рН 3.2, 4.9, 5.5 и 7.2, облучались лазерным импульсным излучением (355 нм, 3 мДж/импульс, 10 Гц) в анаэробных условиях. Пробы облученных различные временные образцов, отобранные через интервалы фотолиза, были хроматографии проанализированы с помощью высокоэффективной жидкостной с детектированием веществ по УФ поглощению (ВЭЖХ-УФ-анализ) для количественной оценки деградации реагентов. Динамика изменения концентраций KNAH- и NTrpH при УФ-Асенсибилизированном фотолизе при различных рН раствора представлена на Рис. 4.1; те же зависимости для NTyrOH и других производных TrpH приведены на Рис. П4.1 Приложения 2.

Линейные области данных концентрационных зависимостей были использованы для расчета квантовых выходов распада исходных реагентов (Φ_{deg}); полученные значения приведены в Таблице П4.1 Приложения 2 и представлены в виде зависимостей Φ_{deg} (pH) на Рис. 4.2.

В случае NTyrOH скорость распада реагентов на начальных стадиях фотолиза практически не зависит от значения pH (Рис. П4.1 (А1-Г1) Приложения 2). Как результат, значения Φ_{deg} как для NTyrOH, так и для KNAH[—] практически не изменяются во всем диапазоне используемых значений pH (Рис. 4.2(А)). Это указывает на незначительное влияние протонирования радикала KNAH₂^{•—} на его реакцию с NTyrO[•].



Рис. 4.1. Изменение концентраций KNAH[—] и NTrpH относительно своих начальных значений (C_0) при анаэробном УФ-А-фотолизе растворов, содержащих 0.3 мМ KNAH[—] и 1.0 мМ NTrpH в 150 мМ PBS при pH (A) 3.2, (Б) 4.9, (В) 5.5 и (Г) 7.4. Каждая точка отражает среднее значение и стандартное отклонение, полученные в трех независимых экспериментах.

В случае всех производных TrpH наблюдается значительное замедление распада реагентов в условиях снижения значений pH (Рис. 4.1 и П4.1 Приложения 2). Как видно из Рис. 4.2 (Б–Г), значения Φ_{deg} уменьшаются при понижении pH от 7.4 до 3.2: в два раза для LTrpH и

NTrpHOMe и в три раза для NTrpH. При этом важно отметить, что значения Φ_{deg} при pH 5.5 и 7.4 близки для всех производных TrpH. При pH 5.5 обе кислотно-основные формы радикала KNAH⁻⁻, а именно KNAH₂⁻⁻ и KNAH₃⁺, присутствуют в одинаковых количествах, что, однако, оказывает незначительное влияние на распад реагентов. Основные изменения значений Φ_{deg} наблюдаются при более низких значениях pH, а именно при pH 3.2 для LTrpH и NTrpHOMe и при pH 4.9 для NTrpH, т.е. в ситуациях полного или частичного протонирования радикалов Trp⁺. Данные изменения Φ_{deg} хорошо коррелируют со значениями pKa радикалов соответствующих производных TrpH, см. черные пунктирные линии на Рис. 4.2. Таким образом, полученные результаты указывают на существенное влиянием протонирования Trp⁺ на наблюдаемое снижение значений Φ_{deg} реагентов в области низких значений pH.



Рис. 4.2. Влияние pH на квантовый выход распада реагентов (Φ_{deg}) при анаэробном УФ-Афотолизе растворов 0.3 мМ КNАН[—] в присутствии (A) 4.0 мМ NTyrOH, (Б) 1.0 мМ LTrpH, (В) 1.0 мМ NTrpH и (Г) 1.0 мМ NTrpHOMe в 150 мМ PBS. Красный цвет отражает результаты для КNАН[—], черный – для аминокислот; пунктирные линии – значения pK_a радикалов KNAH₃[•] (красный) и TrpH^{•+} (черный) Каждая точка отражает среднее значение и стандартное отклонение, полученные в трех независимых экспериментах.

4.3. Анализ продуктов УФ-А-сенсибилизированного фотолиза

Для всех исследованных производных ТгрН ВЭЖХ-УФ-МС-анализ не выявил качественных изменений в составе продуктов радикальных реакций по сравнению с данными, полученными ранее для рН 7 (см. Разделы 1.5.2 и 1.5.3 Главы 1). В настоящих экспериментах наблюдалось образование тех же продуктов KNAH[—] и TrpH, о которых сообщалось ранее [25]. Среди них можно выделить следующие группы: (а) дезоксигенированные мономерные и димерные продукты KNAH[—] (1,4-DHQ, 4HQN, ddO-KNA1 и ddO-KNA2, см. химические структуры на Схемах 1.7 и 1.9 Главы 1); (б) одно- и двукратно оксигенированные формы TrpH; (в) несколько димерных кросс-сшивок TrpH, количество которых различно для каждого отдельного производного TrpH. Концентрации всех продуктов монотонно возрастали с увеличением дозы УФ-А излучения; зависимости для некоторых основных продуктов на более поздних стадиях фотолиза указывает на участие первичных продуктов фотолиза во вторичных фотохимических процессах.

Влияние рН на содержание продуктов УФ-А фотолиза NTrpH в присутствии KNAH[—] показано на Рис. 4.3; аналогичные данные для NTyrOH и других производных TrpH показаны на Рис. П4.3 Приложения 2. Концентрации продуктов рассчитывались с использованием площадей хроматографических пиков, полученных с помощью ВЭЖХ-УФ анализа (см. Раздел 2.6 Главы 2). В случае NTyrOH Φ_{deg} реагентов практически не зависит от pH (см. Рис. 4.2 (А) и П4.3 (A2-B2) Приложения 2), поэтому некоторое увеличение количества продуктов при низком значении pH по сравнению с нейтральным pH (в основном 1,4-DHQ и димеров NTyrOH) следует отнести к повышенной эффективности неизвестных вторичных фотохимических процессов при нейтральном pH. pH-зависимость общего количества образовавшихся продуктов TrpH согласуется с зависимостями Φ_{deg} (pH), представленными на Рис. 4.2 (Б-Г). Некоторые pH-зависимые различия в образовании продуктов внутри каждой группы будут обсуждены ниже.



Рис. 4.3. Влияние pH на концентрацию продуктов, образующихся после 120 с анаэробного УФ-А фотолиза 0.3 мМ КNАН[—] и 1.0 мМ NTrpH: (А) – продукты KNАН[—], (Б) – однократно окисленные формы NTrpH и NNFK и (В) димеры NTrpH (обозначены как dT) с соответствующими значениями RT. Вставка (А): те же данные для продуктов 4HQN и ddO-KNA1 на меньшей шкале по оси Концентрация.

(а) Дезоксигенированные продукты KNAH-

Четыре основных продукта деградации KNAH[—] можно разделить на две группы: продукты с потерей карбоксильной группы (4HQN и ddO-KNA1) и кислорода карбонильной группы (1,4-DHQ и ddOKNA2), см. Схемы 1.7 и 1.9 Главы 1. Количества продуктов первой группы монотонно уменьшаются с уменьшением Φ_{deg} при низких значениях pH (см. вставку на Рис. 4.3 (A2, A3)). Однако продукты второй группы демонстрируют неодинаковые изменения концентраций при снижении pH: небольшое уменьшение количества 1,4-DHQ сопровождается практически полным исчезновением ddO-KNA2 при pH 4.9 и ниже (Рис. 4.3 (A) и П4.2, П4.3 Приложения 2). Данный факт указывает на возможное протонирование радикального предшественника второй группы продуктов KNAH[—], что блокирует образование димерного продукта ddOKNA2 и направляет гибель данного интермедиата по пути образования лишь мономерной формы, 1,4-DHQ. Вероятные положения, по которым могло произойти протонирование, блокирующее димеризацию – атом N1 или карбонильная группа при атоме C4 гетероцикла KNAH[—].

(б) Оксигенированные продукты ТгрН

Данные МС-анализа смесей после УФ-А фотолиза показали образование нескольких однократно и двукратно оксигенированных продуктов TrpH, однако лишь немногие из них были обнаружены в количествах, достаточных для определения их концентраций с помощью оптических методов детектирования. Для всех исследованных производных TrpH наиболее распространенным продуктом является NFK, количество которого резко снижается при снижении pH раствора (Рис. 4.3 (Б) и П4.3 Приложения 2). Среди продуктов NTrpH найдены четыре однократно оксигенированных продукта в количествах, доступных для определения их концентрации, при этом их выход растёт при снижении pH от 7 до 3 (Рис. 4.3 (Б) и П4.4 Приложения 2). Другие производные TrpH демонстрируют противоположное поведение: количественно определяемые однократно оксигенированные продукты LTrpH образуются в большем количестве при pH 7 по сравнению с более низкими значениями pH (Рис. П4.3 Приложения 2). Вероятно, данные различия могут быть связаны с различием в общем заряде частиц Trp⁻ и изменением заряда при протонировании атома N индольного кольца: от отрицательного к нейтральному в случае NTrpH и от нейтрального к положительному заряду в случае LTrpH и NTrpHOMe (см. Схему 4.1).

(с) Димеры ТгрН

Для каждой аминокислоты было обнаружено различное количество ковалентно связанных димеров: 5 для NTyrOH и 4, 7 и 6 для LTrpH, NTrpH и NTrpHOMe, соответственно. Абсолютные и относительные количества димеров тирозина практически нечувствительны к изменению pH (Рис. П4.3 Приложения 2). Однако димеры триптофана демонстрируют значительное и неравномерное снижение абсолютных количеств при снижении pH от 7 до 3. Например, некоторые димеры LTrpH (с RT 16.7 и 17.0 мин, Рис. П4.3 Приложения 2) и димеры NTrpH (RT 20.2 и 21.4 мин, Рис. 4.3 (В)) демонстрируют заметно большее падение концентрации при переходе от pH 4.9 к pH 3.2 по сравнению с другими димерами. Вероятно, данный эффект связан с протонированием Trp⁺, что приводит к снижению эффективности комбинации радикалов по разным положениям индольного кольца. Данное предположение можно проиллюстрировать графиком зависимости доли образовавшихся димеров среди общего количества распавшейся аминокислоты от (1) суммарного заряда радикала аминокислоты, Puc. 4.4 (А), и (2) от заряда индольного кольца, Puc. 4.4 (Б).

При построении графиков на Рис. 4.4 предполагалось, что при pH 4.9 все радикалы TrpH находятся примерно в равновесии между двумя формами, Trp'/TrpH'+, и усредненный заряд радикала составляет 0.5 с положительным или отрицательным знаком в зависимости от производного TrpH. Как показано на Рис. 4.4 (А), реакции между радикалами NTyrO' или NTrp'

с отрицательно заряженными аминокислотными остовами (заряд «-1») приводят к повышенному выходу димеров по сравнению с реакциями нейтрально заряженных частиц. Стоит отметить, что димеризация радикалов является кинетическим контролируемой реакцией (константы скорости $(2-6)\times10^8$ M⁻¹c⁻¹ [106]), поэтому взаимная ориентация радикалов более важна для элементарного акта реакции, чем скорость диффузии реагирующих частиц друг к другу в объеме раствора. Вероятно, кулоновское отталкивание между отрицательно заряженными аминокислотными остовами радикалов NTyrO[•] или NTrp[•] при pH 7.4 способствует появлению конфигурации фенольных или индольных колец, благоприятной для образования ковалентной связи. Протонирование индольных фрагментов с образованием TrpH^{•+} оказывает противоположное влияние на выход кросс-сшивок, приводя к уменьшению их выхода из-за кулоновского отталкивания между одноименно заряженными фрагментами, Рис. 4.4 (Б).



Рис. 4.4. Отношения суммарных количеств образовавшихся димеров к количествам распавшейся аминокислоты (ΔС(АА)) после анаэробного фотолиза УФ-А в зависимости от (А) общего заряда реагирующих радикальных частиц и (Б) заряда индольного кольца для различных производных TrpH.

Как было отмечено ранее (см. Раздел 1.5.4 Главы 1), в МС-спектрах продуктов КNAH[—]сенсибилизированного фотолиза NTrpH при нейтральном значении pH были также обнаружены слабые сигналы, соответствующие ковалентно связанным аддуктам KNAH[—]-NTrp [25]. В данной работе сшивки KNAH[—]-NTrp, обнаруженные в растворах при нейтральном значении pH, также наблюдались в виде слабых сигналов в спектрах MC; для образцов, облученных в условиях низких значений pH, MC сигналы данных продуктов находились ниже пределов чувствительности используемого масс-спектрометра. Таким образом, изменение pH от 7 к 3 не приводит к увеличению выхода ковалентно связанных аддуктов KNAH-NTrp.

4.4. Увеличение константы скорости обратного переноса электрона от KNAH₂^{•-} к TrpH^{•+} при низких значениях pH

Полученные результаты показывают, что снижение pH существенно снижает значения Ф_{deg} как для KNAH[—], так и для TrpH без существенных изменений в составе образующихся продуктов. Данный факт также отражается в соотношении $\Phi_{deg}(TrpH)/\Phi_{deg}(KNAH^{-}) \approx 2.2-3$, которое практически нечувствительно к изменению pH для всех производных TrpH, см. Таблицу П4.1 Приложения 2. Таким образом, изменение pH в диапазоне 3–7 изменяет преимущественно константы скорости реакций 4.1 и 4.2 между радикалами KNAH₂^{•-/}KNAH₃[•] и Trp[•]/TrpH^{•+} без вклада реакций, которые могут приводить к образованию новых продуктов, а также без существенного изменения констант скорости уже известных реакций 4.3-4.7:

$$KNAH_{2}^{\bullet-}/KNAH_{3}^{\bullet} + Trp^{\bullet}/TrpH^{\bullet+} \rightarrow KNAH^{-} + TrpH (+ H^{+})$$

$$(4.1)$$

$$KNAH_2^{\bullet-}/KNAH_3^{\bullet} + Trp^{\bullet}/TrpH^{\bullet+} \rightarrow продукты$$
 (4.2)

$$KNAH_{2}^{\bullet}/KNAH_{3}^{\bullet} + O_{2} \rightarrow KNAH^{-} + H^{+} + O_{2}^{\bullet}$$

$$(4.3)$$

$$\Gamma rp^{\bullet}/\Gamma rp H^{\bullet+} + O_2 \rightarrow продукты$$
 (4.4)

 $Trp^{\bullet}/TrpH^{\bullet+} + O_2^{\bullet-} (+H^+) \rightarrow TrpH + O_2$ (4.5)

(4.7)

Наблюдаемые изменения выходов распада ТгрН могут быть объяснены увеличением константы скорости ОПЭ, реакция 4.1, и/или снижением скорости реакций 4.2-4.7, приводящих к образованию продуктов. Для проверки этого предположения с помощью метода лазерного импульсного фотолиза была зарегистрирована и изучена кинетика гибели KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] и Trp[•]/TrpH^{•+} при различных значениях pH.

Кинетические кривые ТА были зарегистрированы на длине волны 470 нм после облучения растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 10.0 мМ ТгрН при рН 3.2, 4.9 и 7.4 лазерными импульсами (355 нм) с энергиями в диапазоне 1–10 мДж/импульс. Кинетические кривые ТА, зарегистрированные при энергии 10 мДж/импульс представлены на Рис. 4.5. Высокие концентрации производных ТгрН были выбраны для быстрого тушения ³KNAH[—] и быстрой генерации радикалов в течение \approx 50 нс после поглощения лазерного импульса. Для минимизации рН-индуцированных изменений интенсивности сигнала ТА, вызванных протонированием KNAH₂^{•—}, кинетические кривые ТА были зарегистрированы на длине волны 470 нм – изобестической точке радикалов KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] (см. Рис. 1.5 (Б), Раздел 1.4.3). Снижение интенсивности сигналов ΔA_{470} при рН 3 обусловлено меньшим значением коэффициента экстинкции TrpH^{•+} по сравнению с коэффициентом экстинкции Trp[•] на данной длине волны [189,190], см. Рис. 1.5 (В).

Кинетические кривые TA на Puc. 4.5 демонстрируют увеличение скорости спада сигнала TA при снижении pH от 7.4 до 3.2, что было установлено с помощью аппроксимации кривых с помощью кинетической схемы реакций радикалов KNAH₂^{•-/}KNAH₃[•] и Trp[•]/TrpH^{•+} в

анаэробных условиях, реакции 4.1, 4.2, 4.7. Система дифференциальных уравнений, соответствующая данным реакциям, не имеет аналитического решения, поэтому решение данной системы было найдено численно (см. подробное описание аппроксимации экспериментальных данных в Приложении 3). Коэффициенты экстинкции KNAH₂•-/KNAH₃• и Trp'/TrpH'+ были взяты из следующих литературных источников: [65,188,189]. В связи с отсутствием данных о влиянии pH на константы скорости димеризации Trp[•] (k_d, peakция 4.7), для каждого производного TrpH значение k_d было взято равным константам скорости димеризации, приведенным в работе [106] для растворов при рН 7. Искомыми параметрами служили (1) сумма констант скорости реакций 4.1 (konb) и 4.2 (knpog), k_R = konb + knpog и (2) начальные концентрации KNAH2[•]/KNAH3[•] и Trp[•]/TrpH^{•+}, C_R, которые принимались равными для радикалов KNAH[—] и TrpH, т.к. генерация обеих частиц происходила в одном акте реакции ³КNАН⁻ с аминокислотами. Корректность выбранной модели подтверждается линейным ростом С_R и независимостью k_R от энергии лазерного импульса (см. Рис. П4.5 Приложения 3). Расчётные кинетические кривые, имеющие наилучшее согласие с экспериментальными данными, показаны на Рис. 4.5 в виде гладких кривых; полученные значения k_R приведены в Таблице 4.1.



Рис. 4.5. Кинетические кривые TA, зарегистрированные на 470 нм после облучения лазерным импульсом (355 нм, 10 мДж/импульс) водных растворов 0.3 мМ KNAH[—] и 10.0 мМ (A) LTrpH, (Б) NTrpH, (В) NTrpHOMe в 150 мМ PBS в анаэробных условиях при pH 3.2, 4.9 и 7.4. Гладкие кривые, выделенные тёмными цветами, были получены при аппроксимировании экспериментальных данных в рамках схемы реакций 4.1, 4.2 и 4.7.

Следует отметить, что кинетические кривые ТА, приведенные на Рис. 4.5, также были аппроксимированы с помощью более сложной кинетической схемы, включающей реакцию радикала $KNAH_2^{-//}KNAH_3^{-}$ и O₂ (реакция 4.3) и последующие реакции между образующимся O₂⁻⁻ и Trp⁺/TrpH⁺⁺ (реакции 4.5, 4.6) наряду с реакциями 4.1, 4.2, 4.7. Константы скорости реакций 4.3 и 4.5, 4.6 были взяты из работ [25] и [75], соответственно; концентрация остаточного O₂ была принята равной 10 мкМ, как это было оценено в работе [25]. Однако дополнение кинетической схемы реакциями, связанными с присутствием O₂, лишь незначительно улучшило расчётные кинетические кривые, что подтверждает малый вклад остаточного O₂ в наблюдаемую кинетику гибели радикалов. В дальнейшем будут обсуждаться только результаты, полученные с использованием более простой схемы.

АК	pН	$k_{\rm R}/10^9 {\rm ~M}^{-1}{\rm c}^{-1}$	$k_{прод}/10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{O\Pi \Theta}/10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$	
	3.2	3.7±0.6	7.4±2.2	3.6±1.1	
LTrpH	4.9	3.1±0.5	12.1±3.6	3.0±0.9	
	7.4	2.6±0.4	10.1±3.0	2.5 ± 0.7	
	3.2	3.8±0.6	8.7±2.6	3.7±1.1	
NTrpH	4.9	3.2±0.5	9.3±2.8	3.1±0.9	
	7.4	2.2±0.3	14.3±4.3	2.1±0.6	
NTrpHOMe	3.0	4.2±0.6	8.8±2.6	4.1±1.2	
	4.9	2.8 ± 0.4	10.9±3.3	$2.7{\pm}0.8$	
	7.4	2.5 ± 0.4	11.8±3.5	$2.4{\pm}0.7$	

Таблица 4.1. Значения констант скорости k_R, k_{прод} и k_{ОПЭ} при различных значениях pH.

Незначительные изменения в составе продуктов KNAH[—] при различных значениях pH (см. Раздел 4.3), при условии конверсии ddO-KNA2 в 1,4-DHQ при pH < 7, дают основание для предположения о том, что деградация KNAH[—] происходит преимущественно в комплексе реакций 4.2. Следовательно, $\Phi_{deg}(KNAH[—])$ можно выразить как

$$\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^{-}) = k_{\text{прод}} / k_{\text{R}} = k_{\text{прод}} / (k_{\text{прод}} + k_{\text{ОПЭ}})$$
(4.8)

Из уравнения 4.8 значения $k_{O\Pi \Im}$ и $k_{прод}$ можно рассчитать следующим образом:

$$k_{\text{OII}} = k_{\text{R}} \times (1 - \Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^{-})); \qquad k_{\text{прод}} = k_{\text{R}} \times \Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^{-}); \tag{4.9}$$

Значения $k_{O\Pi3}$ и $k_{прод}$ были рассчитаны с использованием уравнения 4.9 и значений $\Phi_{deg}(KNAH^{-})$ и k_R из Таблиц П4.1 Приложения 2 и 4.1, соответственно. Итоговые значения $k_{O\Pi3}$ и $k_{прод}$ приведены в Таблице 4.1. Полученные результаты показывают, что при снижении pH от 7.4 до 3.2 значение $k_{O\Pi3}$ увеличивается в 1.5–1.8 раз, а значение $k_{прод}$ уменьшается в 1.4-2.0 раз в зависимости от производного TrpH. Следует отметить, что значение $k_{O\Pi3}$ в 20–50 раз превышает значение $k_{прод}$ для всех исследованных систем и pH (см. Таблицу 4.1). Следовательно, наблюдаемое снижение Φ_{deg} как для TrpH, так и для KNAH⁻ при снижении pH от 7.4 до 3.2 объясняется в большей степени увеличением константы скорости реакции ОПЭ при низких значениях pH раствора.

4.5. Реакция радикала KNAH⁻ с молекулярным кислородом

О быстром окислении KNAH₂^{••} молекулярным кислородом в растворах с нейтральным значением pH, реакция 4.3, ранее было сообщено в работе [25]. Для исследования влияния протонирования KNAH₂^{••} на скорость данной реакции в настоящей работе были зарегистрированы кинетические кривые TA на 500 нм для растворов, содержащих 0.3 мM KNAH⁻ и 5.5 мM NTrpH при pH 4.9 и 7.4 в присутствии различных концентраций O₂.

Варьирование C(O₂) осуществлялось путём барботирования водных растворов аргоном, воздухом и кислородом, что приводило к поддержанию C(O₂) на уровнях 0.01 мМ, 0.28 мМ и 1.4 мМ, соответственно. Высокие концентрации NTrpH использовались для эффективной генерации KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] даже в присутствии высоких концентраций O₂. Энергия лазерных импульсов варьировалась в диапазоне 2–20 мДж; кинетические кривые TA, зарегистрированные при различных значениях pH и энергии лазерного импульса 3 мДж, показаны на Рис. П4.6 (A, Б) Приложения 4.

Кинетические кривые представляют собой сумму поглощений KNAH₂^{•-/}KNAH₃[•] и NTrp[•]. Увеличение концентрации O₂ приводит к увеличению скорости гибели KNAH₂^{•-}/KNAH₃[•] в реакции 4.3. Наблюдаемые кинетические кривые TA были аппроксимированы схемой, предложенной в работе [25]; процедура аппроксимации детально описана в Приложении 4. Полученные константы скорости реакции 4.3 составили $k = (2.3 \pm 0.3) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ и $(2.0 \pm 0.3) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ для pH 4.9 и 7.4, соответственно. Последнее значение хорошо согласуется со значением, ранее измеренным для раствора с нейтральным значением pH [25]. Небольшое увеличение константы скорости на 15% в случае KNAH₃[•] свидетельствует о том, что KNAH⁻⁻-сенсибилизированный фотолиз TrpH и TyrOH является эффективным генератором O₂^{•--} в широком диапазоне pH.

Заключение по материалам главы 4

Полученные результаты показывают, что протонирование $KNAH_2^{\bullet-}$ с образованием $KNAH_3^{\bullet}$ не влияет на его реакционную способность по отношению к Trp[•] и TyrO[•]. Низкие квантовые выходы деградации $KNAH^-$ и TrpH и незначительное изменение состава образующихся продуктов указывают на то, что ОПЭ является основным каналом гибели радикалов, образующихся под действием УФ-А света, в диапазоне pH 3–7. Рассматривая ОПЭ как реакцию, предотвращающую УФ-А-индуцированное необратимое повреждение аминокислот и белков, можно сделать вывод, что его эффективность не меняется существенно при протонировании радикала кинуреновой кислоты.

Протонирование Trp' ускоряет ОПЭ от KNAH₃' к TrpH⁺⁺ за счет более высокого окислительно-восстановительного потенциала пары TrpH/TrpH⁺⁺ по сравнению с TrpH/Trp'. Данный факт приводит к двукратному увеличению константы скорости ОПЭ и соответствующему уменьшению деградации реагентов. Можно ожидать, что в случае увеличения значения pKa(TrpH⁺⁺) до 5.5–6.0, например, внутри белковой глобулы, ускорение ОПЭ между TrpH⁺⁺ в составе белка и KNAH₂⁻⁻⁻ будет происходить даже при слабокислом pH.

Эффективность окисления радикалов KNAH[—] молекулярным кислородом несколько возрастает при протонировании KNAH₂^{•—} с образованием KNAH₃[•], что означает способность KNAH[—] выступать в роли фотосенсибилизатора, продуцирующего O₂^{•—}, в широком диапазоне
pH. Принимая во внимание, что реакция ОПЭ в среде клеток хрусталика глаза будет протекать медленнее, чем в разбавленных водных растворах, KNAH[−]-индуцированные реакции могут быть источником O₂^{•−}, приводящему к повреждению белков (тип фотоповреждений Ib), в широком диапазоне pH.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ РН НА МЕХАНИЗМЫ И ПРОДУКТЫ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ РЕАКЦИЙ МЕЖДУ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ И АМИНОКИСЛОТНЫМИ ОСТАТКАМИ ТРИПТОФАНА И ТИРОЗИНА В СОСТАВЕ БЕЛКА ЛИЗОЦИМА

Белковая глобула может существенно влиять на скорость и состав продуктов радикальных реакций не только за счет стерических, но и за счет кулоновских эффектов, обусловленных распределением заряда по поверхности белковой глобулы, что может облегчать или затруднять различные радикальные реакции. В настоящей главе описаны результаты исследования влияния рН на механизмы и продукты фотоиндуцированных радикальных реакций между KNAH[—] и аминокислотными остатками TrpH и TyrOH в составе лизоцима белка куриного яйца (Hen Egg White Lysozyme, HEWL). HEWL был выбран в качестве модельного белка, поскольку в литературе имеется большое количество данных о его структуре и физикохимических свойствах при различных значениях pH. HEWL является глобулярным белком, структура которого содержит четыре дисульфидных мостика [263]. При варьировании рН в диапазоне 2.2-7.0 гидродинамический радиус и форма белка претерпевают незначительные изменения гидродинамического радиуса и формы [264]. Это позволяет изучать радикальные реакции в условиях, когда вторичная и третичная структуры белка не претерпевают существенных изменений в широком диапазоне pH, что позволяет снизить влияние данного фактора на исход радикальных реакций. Подробная информация о значениях рКа всех аминокислотных остатков в его составе [265] позволяет установить корреляции между распределением заряда внутри HEWL и продуктами, образующимися в радикальных реакциях, инициируемых УФ-А-фотосенсибилизированным излучением.

5.1. Влияние рН на реакцию между ³KNAH⁻ и HEWL

НЕWL содержит в своем составе шесть аминокислотных остатков TrpH и три остатка TyrOH. Молекулярно-динамическое моделирование показало, что все остатки TrpH обладают некоторым доступом к объёму растворителя, в то время как для остатков TyrOH доступ к водному раствору значительно затруднен [79]. Предыдущее исследование УФ-А-индуцированного повреждения HEWL [28] показало, что при нейтральном значении pH ³KNAH[—] реагирует преимущественно с остатками TrpH62, как наиболее доступными для растворителя, без явных признаков протекания реакций с остатками TyrOH. Как было приведено в обзоре литературе (Раздел 1.4.3), для аминокислот в свободном состоянии константа скорости реакции между ³KNAH[—] и TrpH не зависит от pH в диапазоне 3-7, k_q = (2-3)·10⁹ M⁻¹c⁻¹ [188], тогда как в случае ТуrOH k_q увеличивается в два раза, от 0.8·10⁹ M⁻¹c⁻¹ до 1.8·10⁹ M⁻¹c⁻¹, при снижении pH от 7 до 3 [188]. Предполагая возможную аналогичную pH-

зависимость k_q в случае HEWL, константы скорости тушения ³KNAH[—] белком были измерены с помощью лазерного импульсного фотолиза.

Кинетические кривые TA, отражающие гибель ³КNAH⁻ в присутствии различных концентраций HEWL, были зарегистрированы на длине волны вблизи максимума поглощения ³KNAH⁻ (580 нм) при различных энергиях лазерного импульса, при трех значениях pH – 3.1, 4.9 и 7.4; пример кинетических кривых показан на Рис. П5.1 (А) Приложения 5. С увеличением концентрации HEWL наблюдается ускорение гибели ³KNAH⁻ при всех используемых pH. Наблюдаемая кинетика гибели ³KNAH[—] хорошо описывается моноэкспоненциальной функцией, что указывает на псевдомономолекулярную кинетику реакции тушения. Наблюдаемые значения констант скорости (kobs) не зависят от энергии лазерного импульса и линейно возрастают с увеличением концентрации HEWL (Рисунок П5.1 (Б) Приложения 5). С помощью линейной аппроксимации kobs(HEWL) были получены значения ka(HEWL), приведенные в Таблице 5.1. При нейтральном значении pH полученное значение k_a(HEWL) несколько превышает ранее измеренное значение 0.78·10⁹ M⁻¹c⁻¹ [28]. Вероятно, эта разница может быть связана с различной ионной силой используемых растворов: 0.03 М и 0.15 М PBS в настоящей работе и работе [28], соответственно. В случае низкой концентрации буферных солей снижение экранирующего эффекта ионов буферных солей приводит к более высокому эффективному положительному заряду HEWL в водном растворе, как было показано в работе [264]. Как результат, в настоящей работе наблюдается более сильное кулоновское притяжение между отрицательно заряженной частицей ³KNAH⁻ и положительно заряженным HEWL [265] при всех используемых значениях pH. Следует отметить, что k_q(HEWL) не показывает однозначной зависимости от рН, см. Таблицу 5.1.

Таблица 5.1. Значения квантовых выходов разложения KNAH[—], $\Phi_{deg}(KNAH[—])$, и HEWL, $\Phi_{deg}(HEWL)$, образования димерных форм HEWL, $\Phi_{dim}(HEWL)$, и констант скорости $k_q(HEWL)$, k_R , $k_{O\Pi \ni}$, k_{S} при различных значениях pH.

pН	k_q (HEWL) /10 ⁹ M ⁻¹ c ⁻¹	Φ _{deg} (KNAH ⁻) / %	$\Phi_{ m deg}(m HEWL)$ /%	Φ _{dim} (HEWL) / %	$\begin{array}{c} k_{R} \\ /10^{8} \\ M^{-1}c^{-1} \end{array}$	k _{опэ} /10 ⁸ M ⁻¹ c ⁻¹	k _{прод} /10 ⁸ M ⁻¹ c ⁻¹	$\begin{array}{c} k_{S} \\ /10^{8} \\ M^{-1}c^{-1} \end{array}$
3.1	0.8 ± 0.2	2.7 ± 0.7	1.5 ± 0.2	0.06 ± 0.01	10.7 ± 2.1	10.3 ± 2.1	0.4 ± 0.2	3.5 ± 0.7
4.9	1.5 ± 0.3	2.9 ± 0.5	1.9 ± 0.3	0.11 ± 0.02	10.0 ± 2.0	9.6± 1.9	0.4 ± 0.2	2.9 ± 0.6
7.3	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.3	0.76 ± 0.11	8.7 ± 1.8	8.5 ± 1.7	0.2 ± 0.1	0.9*

* при рН 6.2 [266]

Данный факт указывает на (1) незначительный вклад повышения реакционной способности ³KNAH₂ по отношению к ТугОН в составе HEWL в кислой среде и (2) малое влияние pH на доступность остатков TrpH/TyrOH для растворителя несмотря на существенное изменение заряда HEWL при варьировании pH раствора [265].

Для проверки участия остатков ТугОН в реакции HEWL с ³KNAH^{-/3}KNAH₂ были зарегистрированы спектры ТА при различных значениях pH, см. Рис. 5.1.



Рис. 5.1. Спектры промежуточного поглощения, зарегистрированные через 12 мкс после облучения лазерным импульсом (355 нм) водных растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 1.0 мМ HEWL в 30 мМ PBS при pH (A) 7.4, (Б) 4.9, (В) 3.0. Сплошные линии – суммы спектров поглощения KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] и Trp[•]/TrpH^{•+}, взятые из работ [25,65,188,189], для соответствующих значений pH: (A) KNAH₂^{•—} + Trp[•] для pH 7.4, (Б) 0.75 × KNAH₃[•] + 0.25 × KNAH₂^{•—} + Trp[•] для pH 4.9, (С) KNAH₃[•] + 0.4 × Trp[•] + 0.6 × TrpH^{•+} для pH 3.1.

Полоса поглощения с максимумом на 510 нм соответствует Тгр' [65,190] и является основной во всем диапазоне используемых pH. Для иллюстрации вклада ТугО' в спектры TA на Puc. 5.1 также приведены суммы спектров поглощения для кислотно-основных форм радикалов KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] и Trp[•]/TrpH^{•+}, взятые из работ [25,65,188,189]. Снижение pH раствора приводит к появлению в спектре TA второй полосы поглощения с максимумом около 410 нм, что является характерной особенностью радикала ТугО[•] [267]. Следует отметить, что небольшой вклад радикала ТугО[•] в суммарные спектры TA наблюдается даже при нейтральном значении pH, о чём не было сообщено ранее [25]. Вероятно, данный эффект связан с использованием в настоящей работе более высоких энергий лазерного импульса по сравнению с результатами работы [25], что повышает концентрацию регистрируемых частиц и,

соответственно, соотношение сигнал/шум, что позволяет наблюдать сигнал от ТугО[•] на фоне других частиц. Кроме того, выход радикалов HEWL в настоящей работе был несколько выше из-за увеличения k_q вследствие использования более низкой концентрации буферных солей. Таким образом, снижение pH увеличивает вклад остатков ТугОH в тушение ³KNAH[—] или, другими словами, изменяет доступность остатков TrpH и TyrOH для растворителя, усиливая конкуренцию между аминокислотными остатками за ³KNAH[—] при низких значениях pH.

5.2. Значение рКа катион-радикала TrpH в составе HEWL

В исследовании НЕWL методом импульсного радиолиза [223] было сообщено значение pKa(TrpH⁺⁺) = 3.1 для TrpH⁺⁺ в составе HEWL. Это значение существенно ниже, чем pKa(TrpH⁺⁺) = 4.3 для LTrpH в свободном состоянии, и не согласуется с увеличением pKa(TrpH⁺⁺) в случае производных TrpH с замещенными N- и C-концами (см. Главу 4) и нахождения TrpH в составе пептидов [222]. По-видимому, сообщенное понижение значения pKa следует объяснять стабилизацией Trp⁺ за счет электростатических взаимодействий внутри глобулы HEWL. Данное предположение согласуется с тем фактом, что pKa аминокислотных остатков в составе белка могут существенно отличаться от pKa аминокислот в свободном состоянии. Например, pKa аминокислоты глутамин (Glu) в свободном состоянии равна 4.2, однако pKa аминокислотного остатка Glu35 в составе активного центра HEWL имеет более высокое значение, pKa = 6.1. Повышение pKa в данном случае связано с энергетической невыгодностью образования аниона Glu35 и сильного кулоновского отталкивания между отрицательно заряженными аминокислотными остатками ферментативного центра [265].

В настоящей работе значение pKa для TrpH⁺⁺ в составе HEWL, pKa(HEWL-TrpH⁺⁺), было определено методом лазерного импульсного фотолиза. Для установления значения pKa(HEWL-TrpH⁺⁺) была зарегистрирована кинетическая кривая TA на длине волны 580 нм в широком диапазоне pH, аналогично методике, описанной в Главе 3. Как было показано ранее [65,189], появление протонированной формы Trp⁺ в растворе вызывает заметный сдвиг максимума полосы в спектре TA в красную область, с 510 на 580 нм. Регистрация проводилась в аэробных условиях для эффективного удаления KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] из растворов с помощью реакции радикалов с O₂. Некоторые из зарегистрированных кинетических кривых TA показаны на Puc. 5.2 (A). Быстрые начальные спады сигналов TA отражают исчезновение KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] в реакции с O₂, а долгоживущие сигналы TA соответствуют медленной гибели Trp⁺/TrpH⁺⁺. Зависимость значений ΔA_{580} (4 мкс) от pH продемонстрирована на Вставке Puc. 5.2 (A). Аппроксимация полученной pH-зависимости кривой титрования в предположении присутствия одной константы кислотно-щелочного равновесия приводит к значению pKa(HEWL-TrpH⁺⁺) = 3.1. Хорошее согласие между двумя методами – импульсным радиолизом [223] и лазерным импульсным фотолизом (Рис. 5.2 (A)) – подтверждает, что глобула HEWL оказывает значительное влияние на значение pKa(TrpH^{*+}), которое противоположно случаям для TrpH в составе ди- и трипептидов [222]. Возможным объяснением этого феномена является то, что образование положительного заряженного TrpH^{*+} может вызывать существенные возмущения во внутренней структуре HEWL, что делает образование TrpH^{*+} энергетически невыгодным процессом, смещая равновесие в сторону нейтрально заряженного Trp^{*}. Таким образом, значительные сдвиги pKa(TrpH^{*+}), индуцированные аминокислотным окружением TrpH внутри белковой глобулы, можно ожидать и для других TrpH-содержащих белков. Следует отметить, что наши данные не дают ответа какой из остатков Trp, подвергается протонированию при pH < 3.1.



Рисунок 5.2. (А) Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на 580 нм после облучения лазерным импульсом (355 нм, 13 мДж) растворов 0.3 мМ KNAH[—] и 1.0 мМ HEWL в 30 мМ PBS, в аэробных условиях при различных значениях pH. Вставка: зависимость ΔA_{580} от pH через 4 мкс после лазерного импульса; гладкая кривая является расчетной кривой, полученной при аппроксимации экспериментальных данных в предположении существования одного значения pKa в данной области pH. (Б) Кинетические кривые TA, зарегистрированные на 515 нм после облучения лазерным импульсом (355 нм, 10 мДж) растворов 0.3 мМ KNAH[—] и 1.0 мМ HEWL в анаэробных условиях при различных значениях pH. Гладкие кривые получены при аппроксимации экспериментально измеренных кинетических кривых схемой уравнений 5.1-5.8.

5.3. Реакции радикалов KNAH⁻⁻ и HEWL

Последующие реакции между радикалами, образующимися в реакции между ³KNAH[—] и HEWL-TrpH, реакция 5.1, могут быть описаны схемой реакций 5.2–5.8, предложенной ранее для растворов с нейтральным значением pH [28]. Следует отметить, что реакция тушения 5.1 протекает по PCET-механизму, как это было показано для TrpH в свободном состоянии, см. Главу 3.

$${}^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{HEWL-TrpH} \rightarrow \text{KNAH}_{2}^{\bullet-} + \text{HEWL-Trp}^{\bullet}$$
 (5.1)

 $KNAH_{2}^{\bullet-} + HEWL-Trp^{\bullet} \rightarrow KNAH^{-} + H^{+} + HEWL-Trp^{-}$ (5.2)

$$KNAH_2^{\bullet-} + HEWL-Trp^{\bullet} \to продукты$$
 (5.3)

$$KNAH_2^{\bullet-} + O_2 \rightarrow KNAH^- + H^+ + O_2^{\bullet-}$$
(5.4)

HEWL-Trp [•] + O_2 → продукты	(5.5)
$O_2^{\bullet-} + \text{HEWL-Trp}^{\bullet} \rightarrow O_2 + \text{HEWL-Trp}^{-}$	(5.6)
O_2 •— + HEWL-Trp• → продукты	(5.7)
HEWL-Trp [•] + HEWL-Trp [•] \rightarrow димеры HEWL	(5.8)

Реакция ОПЭ с восстановлением исходных реагентов, реакция 5.2, является основным каналом гибели образующихся радикалов KNAH⁻ и аминокислот как в свободном состоянии (см. Главу 4, [25]), так и для их остатков в составе белка альфа-кристаллина [24] и HEWL [28]. Как было показано в Главе 4 настоящей работы, для аминокислот в свободном состоянии константа скорости ОПЭ практически не зависит от протонирования KNAH2^{•--}, но увеличивается в два раза при протонировании Trp[•]. Также в Главе 4 было показано, что как KNAH₂^{•--}, так и KNAH₃[•] легко окисляются O₂ с константами скорости $\approx 2 \cdot 10^9$ M⁻¹c⁻¹, реакция 5.4. Реакция HEWL-Trp' с молекулярным кислородом, 5.5, протекает намного медленнее реакций между радикалами. Так, в исследовании [266] вклад реакции между HEWL-Trp[•] и O₂ в гибель HEWL-Trp' в растворах, насыщенных O₂, было невозможно оценить на фоне быстрой гибели HEWL-TyrO[•] в реакциях 5.6, 5.7 и 5.8. Пути реакций между $O_2^{\bullet-}$ и HEWL-Trp[•], реакции 5.6 и 5.7, не были исследованы отдельно друг от друга; суммарная константа скорости реакции между О2^{•-} и HEWL-Trp[•] (ks) составляет значение (1-2)·10⁹ М⁻¹с⁻¹ при pH 6.2 [266]. Данные эффекты ещё более выражены для бимолекулярной реакции ковалентного соединения двух радикальных центров: в то время как константы скорости реакции 4.7 для радикалов Trp'/TyrO' свободных аминокислот составляют $(2-6) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [75,76,106], константа скорости реакции 5.8 (k_d) для тех же радикалов в составе глобулы HEWL снижается до (1-6)·10⁶ M⁻¹c⁻¹ [266,268]. Таким образом, крупная глобула белка существенно замедляет бимолекулярные реакции за счет как стерических затруднений, так и более медленной диффузии молекулы белка в жидком растворе. Подводя итог, можно отметить, что основное повреждение белковой глобулы происходит в результате реакций 5.3, 5.7, 5.8.

5.4. Гибель радикалов KNAH⁻⁻ и HEWL при различных значениях рН

В настоящей работе влияние pH на радикальные реакции между $KNAH_2^{\bullet}/KNAH_3^{\bullet}$ и HEWL-Trp⁺/HEWL-TrpH⁺⁺ было изучено аналогично ранее описанной методике для аминокислот в свободном состоянии, см. Главу 4. Все эксперименты проводились при трех значениях pH в диапазоне 3.1–7.4, соответствующих всем возможным парам реагирующих радикалов: $KNAH_3^{\bullet}$ + HEWL-TrpH⁺⁺ при pH 3.1, $KNAH_3^{\bullet}$ + HEWL-Trp⁻ при pH 4.9 и $KNAH_2^{\bullet}$ + HEWL-Trp⁻ при pH 7.4. Следует отметить, что при pH \approx 3 радикал TrpH в составе HEWL существует в обеих формах, HEWL-Trp⁻ и HEWL-TrpH⁺⁺, примерно в равных количествах, (см.

Раздел 5.2). Более низкие значения pH не были исследованы по причине неизвестных фотохимических свойств протонированной формы KNAH⁻⁻, KNAH₂; pKa(KNAH₂) = 2.5 [185,187]. Другими словами, pH \approx 3 – это минимально возможное значение pH для сохранения доминирования формы KNAH⁻⁻ при всех используемых значениях pH. Различие в характере радикальных реакций с участием форм HEWL-Trp[•] и HEWL-TrpH^{•+} можно выявить путем сравнения результатов при pH 3.1 и 4.9.

В случае свободных аминокислот, см. Главу 4, изменения констант скорости ОПЭ были измерены с помощью кинетических кривых ТА, непосредственно отражающих кинетику гибели радикалов. В случае HEWL для исследования влияния pH на скорость ОПЭ были зарегистрированы кинетические кривые TA на длине волны 515 нм после облучения лазерным импульсом (355 нм) растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 0.35 мМ HEWL при pH 3.1, 4.9 и 7.4, с варьированием энергии лазерных импульсов в диапазоне 4–20 мДж. Примеры кинетических кривых TA показаны на Рис. 5.2 (Б) (энергия 15 мДж/импульс). Длина волны 515 нм была выбрана в качестве изобестической точки радикалов Trp⁺/TrpH⁺⁺ [65,189,190] для минимизации pH-индуцированных изменений в интенсивности сигнала TA. Быстрый спад сигнала TA в начальной области кинетических кривых, соответствующий гибели ³KNAH[—], становится более заметным при низких значениях pH на фоне значительного уменьшения значения ε₅₁₅ при протонировании KNAH₂⁻⁻ с образованием KNAH₃⁻⁻ (см. Схему. 1.5 (Б)) [188]. При нейтральном значении pH значения ε₅₁₅ для ³KNAH[—] и KNAH⁻.

Аналогично анализу кинетики гибели радикалов аминокислот в свободном состоянии, см. Главу 4, анализ кинетики гибели радикалов НЕWL сначала был проведен с учётом лишь O₂независимых реакций 5.2, 5.3, 5.8, см. детали аппроксимации в Приложении 6. Система дифференциальных уравнений, соответствующая реакциям 5.2, 5.3, 5.8, не имеет аналитического решения и решалась численно. Однако, в отличие от случая аминокислот, в случае реакций радикала HEWL удовлетворительного согласия между экспериментальными и расчётными кинетическими кривыми данными не удалось достичь из-за значительного вклада реакций 5.4, 5.6, 5.7. В случае белка, из-за существенно меньшей константы скорости ОПЭ, реакция 5.2, для объемной молекулы HEWL реакция 5.4 вносит вклад в гибель KNAH₂^{•−} даже при низкой концентрации O₂. Для упрощения анализа аппроксимация кинетических кривых TA расчётными кривыми проводилась только для начальных участков, характеризующихся наиболее выраженными изменениями концентрации реагирующих радикалов. Следует отметить, что в литературных данных значения ks (сумма констант скорости реакций 5.6 и 5.7) приведены только для ограниченного диапазона pH 5.8–9.0 [266], а для k_d приведены только для рн 6.2 [266]. Для анализа кинетики радикалов при нейтральном значении pH были применены значения k_S и k_d для pH 6.2 [266]; для растворов с более низкими значениями pH значение k_S было найдено с помощью аппроксимации. Поскольку из-за невысокого значения k_d по сравнению с $k_{O\Pi 3}$ влияние реакции димеризации на начальный участок кинетики незначительно, k_d = 4.5·10⁶ M⁻¹c⁻¹ для pH 6.2 [266] была принята pH-независимой.

При всех исследованных значениях pH искомыми параметрами были начальные концентрации ³KNAH[—], C₀(³KNAH[—]), и сумма констант скорости ОПЭ и образования продуктов в реакциях 5.2 и 5.3, соответственно, $k_R = k_{OID} + k_{npon}$. При pH 7 третьим искомым параметром была концентрация остаточного кислорода в растворе, C(O₂). Найденное среднее значение C(O₂) было далее зафиксировано для анализа кинетических кривых TA для pH 4.9 и 3.1. В последнем случае третьим искомым параметром была сумма констант скорости реакций 5.6 и 5.7, ks, значение которой для pH 7 было взято из работы [266]. Монотонное увеличение C₀(³KNAH[—]) и независимость значений C(O₂), k_R и k_S от энергии лазерного импульса (Рис. П5.2 Приложения 6) свидетельствует о корректности использованного подхода. Наилучшие результаты аппроксимации соответствуют значения k_R ≈ 10⁹ M⁻¹c⁻¹ и почти не зависят от pH в пределах погрешности измерений (Таблица 5.1). Полученные значения k_R для HEWL, около 10⁹ M⁻¹ c⁻¹, как и ожидалось для случая белка, оказались значительно ниже соответствующих значений для аминокислот в свободном состоянии, (2–4)·10⁹ M⁻¹c⁻¹ (см. Таблицу 4.1, Раздел 4.4), однако значительно превышают значения k_S и k_d, равные 9·10⁷ M⁻¹c⁻¹ и 4.5·10⁶ M⁻¹c⁻¹, соответственно, при pH 6.2 [266].

Следует отметить, что результаты аппроксимации показали четырехкратное увеличение значения k_s при снижении pH от 7.4 до 3.1, что (1) указывает на повышенную реакционную способность протонированной формы $O_2^{\bullet-}$, HO₂, по отношению к HEWL-Trp[•] и HEWL-TyrO[•] и (2) подтверждает тенденцию, ранее сообщенную в работе [266], при которой снижение pH от 9.0 до 5.8 приводит к двукратному увеличению k_s . Обнаруженное увеличение k_s согласуется с увеличением константы скорости реакции HO₂[•] с радикалами флавина и аскорбата в 5 и 20 раз, соответственно, при аналогичном снижении pH [38]. Следует подчеркнуть, что данных, полученных в настоящей главе, недостаточно, чтобы различить вклад каналов 5.6 и 5.7 в реакцию между $O_2^{\bullet-}$ и HEWL-Trp[•].

5.5. УФ-А-фотолиз KNAH⁻ и HEWL при разных значениях рН

Ранее было показано, что фотолиз KNAH[—] и HEWL сильно зависит от соотношения концентраций радикалов, образующихся под действием УФ-А-излучения, и O_2 , присутствующего в растворе [28]. Важность этого соотношения обусловлена быстрым окислением KNAH²[•] молекулярным кислородом, реакция 5.4, с восстановлением KNAH[—] в основном состоянии и образованием $O_2^{•}$ [25]. В случае доминирования радикалов основными

путями реагирующих частиц являются прямые реакции между свободными радикалами КNAH[—] и HEWL, реакции типа Ia (реакции 5.2, 5.3, 5.8). В противоположной ситуации образовавшиеся радикалы гибнут в реакциях типа Ib (реакции 5.4–5.7). Сообщалось, что выход деградации реагентов более чем на порядок выше в случае реакций типа Ia [28]. Столь существенная разница была объяснена преобладанием реакции ОПЭ между O_2^{\bullet} и HEWL[•] с восстановлением исходных реагентов, реакция 5.6, при протекании фотохимических реакций по типу Ib.

Полагая, что для анаэробных тканей, например, для ядра хрусталика глаза, где $C(O_2) < 2$ мкМ [161], более физиологически значимыми являются прямые реакции между радикалами фотосенсибилизаторов и белками (реакции типа Ia), все дальнейшие эксперименты проводили в анаэробных условиях, т.е. в условиях интенсивного барботирования аргона через образец. При использованных энергиях лазерных импульсов концентрации образующихся радикалов составляли около 10–20 мкМ, а концентрация остаточного кислорода \approx 15 мкМ, см. Рис. П5.2 (Б) Приложения 6. Пробы, отобранные во время фотолиза раствора 0.3 мМ KNAH[—] и 0.35 мМ HEWL при рН 3.1, 4.9 и 7.4, были далее проанализированы различными методами.

5.6. Ферментативная активность HEWL до и после УФ-А фотолиза при различных значениях рН

Белок HEWL обладает мурамидазной активностью, т.е. способностью расщеплять клеточные стенки бактерий. Мурамидазная активность HEWL до и после УФ-А фотолиза при различных pH была измерена как скорость уменьшения светорассеяния суспензии клеток бактерии M. lysodeikticus на длине волны 450 нм при добавлении HEWL в раствор. На Рис. 5.3 показана ферментативная активность HEWL в зависимости от концентрации белка в растворе до (А) и после (Б) УФ-А-фотолиза белка при различных значениях pH. Измерения проводились при pH 6.2, оптимальном для ферментативной активности HEWL.

На Рис. 5.3 (А) показано, что выдерживание HEWL в водных растворах при различных значениях pH в течение нескольких часов без облучения УФ-А светом оказывает незначительное влияние на его ферментативную активность. Облучение УФ-А светом приводит к значительному снижению каталитической активности HEWL, степень которого совпадает для pH 4.9 и 7.4 в диапазоне используемых концентраций белка (1–4 мкг/мл). Интересно отметить, что HEWL, облученный в растворе при pH 3.1, не демонстрирует изменений в ферментативной активности по сравнению с необлученным белком.



Рис. 5.3. Ферментативная активность HEWL (А) до и (Б) после анаэробного УФ-А фотолиза при различных значениях рН: 3.1 (красный цвет), 4.9 (зеленый цвет) и 7.4 (синий цвет); активность HEWL до УФ-А фотолиза обозначена на Рис. (Б) черным цветом. Уменьшение светорассеяния суспензии клеток М. Lysodeikticus на длине волны 450 нм измерялось в водных растворах, содержащих 50 мМ PBS, при рН 6.2 и различных концентрациях HEWL. Ферментативная активность была охарактеризована как изменение оптического поглощения раствора (ΔA_{450}) в минуту.

5.7. Анализ кросс-сшивок HEWL с помощью гель-электрофореза

Анализ с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии денатурирующего агента, SDS, показан на Рис. 5.4. Дорожки 2–5 соответствуют различным дозам лазерного облучения – от 0 до 8 мин УФ-А фотолиза при потоке энергии 1.4 Дж/мин. При всех значениях pH интенсивность полос, соответствующих димерам и тримерам HEWL, увеличивается с увеличением дозы облучения. Образование кросс-сшивок HEWL наиболее выражено при pH 7.2 и демонстрирует резкое снижение выхода при значениях pH < 7.

Количество мультимерных форм HEWL было оценено с помощью денситометрического анализа двух наборов гелей с разной нагрузкой белка на дорожку: 2.5 мкг/дорожка (Рис. 5.4) и 1.0 мкг/дорожка (Рис. П5.3 Приложения 7). Абсолютные количества кросс-сшитых форм HEWL при pH 7.2 были определены для гелей с низкой белковой нагрузкой (Рис. П5.4 Приложения 7) по причине насыщения затемнения соответствующей области для гелей с высокой белковой нагрузкой (Рис. 5.4). Полученные величины далее были использованы для расчета содержания малых количеств кросс-сшитых белков, образованных в растворах при низких значениях pH, для гелей с высокой белковой нагрузкой, см. Рис. 5.4. Относительное содержание димеров HEWL среди общего количества форм HEWL после облучения раствора белка дозой УФ-А излучения 11 Дж составило 2.1 \pm 0.5 %, 3.8 \pm 0.8 % и 27 \pm 5 % при pH 3.0, 4.9 и 7.2, соответственно. Приведенные количества димеров соответствуют следующим квантовым выходам димеризации (Φ_{dim}): Φ_{dim} (pH 3.0) = 0.06 \pm 0,01 %, Φ_{dim} (pH 4.9) = 0.11 \pm 0.03 % и Φ_{dim} (pH 7.2) = 0.76 \pm 0.11 %. Для нейтрального pH полученное значение хорошо согласуется с

ранее сообщенным в работе [28]. Динамика изменения количеств мономерных и димерных форм HEWL во время УФ-А фотолиза приведена на Рисунке П5.4 Приложения 7.



Рис. 5.4. SDS-ПААГ(15%)-электрофорез проб, отобранных во время УФ-А фотолиза 0.3 мМ КNАН[—] и 0.35 мМ HEWL при различных рН: (А) рН 3.0, (Б) рН 4.9, (В) рН 7.4; количество HEWL, добавленного на одну дорожку, составляет 2.5 мкг. Дорожки 1 для каждого геля содержат стандарты молекулярной массы; дорожки 2–5 содержат пробы отобранные после 0, 2, 4 и 8 минут УФ-А фотолиза, соответственно.

Для доказательства фотохимического происхождения образующихся димеров HEWL были также проведены два контрольных эксперимента. В первом контроле образцы барботировались аргоном без УФ-А-излучения, а во втором растворы HEWL были облучены УФ-А-светом в отсутствии KNAH[—]. В обоих экспериментах не наблюдалось образования сшитых белков (Рис. П5.5 Приложения 7, слева). Пробы также были проанализированы в невосстанавливающих условиях для контроля фотоиндуцированного образования кросс-сшивок HEWL через дисульфидные мостики с участием остатков CysSH. Отсутствие визуальных изменений в суммарной интенсивности полос, соответствующих димерным формам HEWL, как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях (Рис. П5.5 Приложения 7, справа) демонстрирует незначительное участие дисульфидных связей в УФ-А-индуцированном ковалентном связывании HEWL при всех используемых значениях pH.

5.8. ВЭЖХ-УФ-МС анализ продуктов фотолиза с низкой молекулярной массой

Растворы молекул с малой молекулярной массой, присутствующих в образцах после фотолиза, были получены фильтрацией проб, отобранных во время УФ-А фотолиза, с использованием фильтров с отсечением по молекулярной массе (3 кДа). Далее полученные растворы были проанализированы с помощью ВЭЖХ-УФ-МС анализа. Динамики изменения концентрации KNAH[—] во время УФ-А фотолиза при различных значениях pH показаны на Puc. 5.5 (А); сравнение данных динамик показывает явное ускорение распада KNAH[—] при увеличении кислотности раствора. Значения $\Phi_{deg}(KNAH[—])$ рассчитаны на основе линейной аппроксимации динамик С(KNAH[—]) и приведены в Таблице 5.1.



Рис. 5.5. (А) Зависимость С(КNAH[—]) от времени УФ-А фотолиза; (Б) концентрации продуктов КNAH[—], образующиеся после 8 мин УФ-А фотолиза при облучении растворов 0.3 мМ KNAH[—] и 0.35 мМ HEWL в буферных растворах при рН 3.1 (красный цвет), 4.9 (зеленый цвет) и 7.4 (синий цвет).

Согласно схеме реакций 5.1–5.8, КNAH₂^{•–}/КNAH₃[•] гибнет в реакциях 5.2–5.4, при этом образование продуктов KNAH[—] происходит только в реакции 5.3. Следовательно, значение Φ_{deg} (KNAH[—]) можно выразить через соотношение скоростей данных реакций, т.е. произведение констант скорости и начальных концентраций реагирующих веществ, детали расчётов приведены в Приложении 8. Концентрации частиц (Рис. П5.2 (А) Приложения 6) были получены путем аппроксимации кинетических кривых ТА, приведенных на Рис. 5.2 (Б), и использованы для оценки значений k_{OIT9} и k_{npog} ; итоговые значения k_{OIT9} и k_{npog} приведены в Таблице 5.1. Значения констант показывают, что k_{OIT9} не зависит от pH, в то время как k_{npog} демонстрирует почти двукратное увеличение при pH < 7. Несмотря на тот факт, что изменение значения k_{npog} хорошо коррелирует с протонированием KNAH₂^{•–}, другие pH-индуцированные изменения, связанные с белковой глобулой (доступность растворителя, кулоновские эффекты) также могут вносить вклад в наблюдаемую зависимость k_{npog} (pH). Стоит отметить, что величина k_{OIT9} более чем на порядок превышает k_{npog} , что в сочетании с эффективной реакцией 5.4 приводит к небольшому выходу деградации KNAH[—].

Среди малых молекул основными продуктами фотолиза являются описанные ранее дезоксигенированные мономерные и димерные формы KNAH[—] (см. Главу 4, [25,28]). Общее количество продуктов, образующихся в растворе при различных значениях pH, хорошо коррелирует со значениями Φ_{deg} (pH). Как и в случае фотолиза свободных аминокислот, количество димерного продукта ddO-KNA2 резко уменьшается при pH < 5 с одновременным увеличением количества его мономерного аналога 1,4-DHQ. Данный факт ещё раз подтверждает гипотезу о протонировании радикального предшественника данных продуктов при pH < pKa (KNAH₃[•]), что блокирует образование димерных продуктов, направляя реакцию только по пути образования мономеров. Вторая группа продуктов (4HQN и ddO-KNA1)

демонстрирует противоположное поведение при снижении pH: уменьшение мономерного продукта 4HQN и увеличение димерного продукта ddO-KNA1. Скорее всего, протонирование их радикального предшественника, напротив, облегчает образование димерной формы.

5.9. ВЭЖХ-УФ-МС анализ HEWL до и после УФ-А фотолиза

Хроматограммы полного ионного тока (Total Ion Current, TIC), зарегистрированные с помощью ВЭЖХ-УФ-МС-анализа образцов до и после УФ-А фотолиза при различных значениях pH, показаны на Рис. 5.6 (А). Широкий пик с максимумом на 19.6 мин и плечом на 18.9 мин отражает элюирование неповреждённого HEWL. Деконволюция масс-спектров, полученных для данной области RT, показала, что основной пик содержит неповрежденный HEWL с m/z 14304.875 [M + H⁺]⁺. Плечо пика соответствует нескольким оксигенированным формам HEWL, присутствующим в том числе в неповрежденном коммерчески доступном белке, со сдвигами масс +16 × i Да по сравнению с неповрежденным HEWL, где i = 1, 2, ... (Рис. П5.6 (А1) Приложения 9).

УФ-А фотолиз при всех исследованных значениях pH приводит к уменьшению интенсивности основного пика HEWL и увеличению интенсивности плеча, значение RT которого незначительно смещается в диапазоне 18.7–19.1 мин в зависимости от pH (Puc. 5.6 (A)). Концентрация исходного HEWL одинаково снижалась при всех использованных значениях pH (см. Рис. П5.6 (слева) Приложения 9). Интересно отметить, что количество однократно и дважды оксигенированных форм HEWL значительно возрастает только при pH < 7, с небольшим снижением начального количества однократно окисленных форм HEWL при pH 7.2 (Рис. П5.6 (слева) Приложения 9).

УФ-А-индуцированная деградация HEWL практически не зависит от pH, как это видно из Puc. 5.6 (Б); значения Φ_{deg} (HEWL), рассчитанные по этим данным, приведены в Таблице 5.1. На Puc. 5.6 (В) представлены суммарные изменения в количествах некоторых продуктов HEWL, накопленные в процессе УФ-А-облучения. Как было отмечено выше, наиболее выраженные pH-зависимые отличия наблюдались для HEWL+O (+16 Да) и +2O (+32 Да). Выход модификации с ковалентным присоединением KNAH[—] к HEWL, наблюдавшейся ранее в работе [28], увеличивается при низких значениях pH незначительно по сравнению с оксигенированными продуктами, Puc. 5.6 (В). Структура ковалентной сшивки соответствует брутто-формуле нейтрально заряженного продукта HEWL(-H,+KNAH) и в дальнейшем будет условно обозначена как HEWL(+KNAH[—]). Следует отметить, что количества продуктов, представленные на Puc. 5.6 (В), были получены в предположении равной эффективности ионизации для исходного и модифицированного HEWL. Следовательно, данные результаты следует рассматривать как полуколичественные данные, иллюстрирующие pH-индуцированные различия, но не измерение абсолютных значений концентраций.



Рис. 5.6. ВЭЖХ-УФ-МС-анализ НЕWL до и после анаэробного УФ-А фотолиза 0.3 мМ КNAH[—] и 0.35 мМ НЕWL (10 Дж поглощенной энергии), при различных значениях pH: 3.1 (красный), 4.9 (зеленый) и 7.4 (синий). (А) Хроматограммы полного ионного тока. (Б) Зависимость концентрации неповрежденного HEWL со средней массой 14303.85 Да относительно начального значения (С₀) от времени фотолиза при различных значениях pH. (В) Изменения концентраций мономерных форм модифицированного HEWL ($\Delta C = C(после УФ-А фотолиза) - C_0$): однократно (+16 Да) и дважды (+32 Да) оксигенированного HEWL и HEWL(+KNAH[—]) (+187 Да).

5.10. Трипсинолиз HEWL после УФ-А фотолиза

Для локализации УФ-А-индуцированных модификаций белка и определения характера модификаций, пробы HEWL до и после УФ-А-фотолиза были подвергнуты ферментативному гидролизу с использованием фермента трипсина и далее проанализированы с помощью ВЭЖХ-УФ-МС анализа. Было установлено, что, аналогично работе [28], под действием УФ-Аизлучения модификации были подвергнуты только пептиды, содержащие остатки TrpH, TyrOH и MetSH. Перечень модифицированных пептидов, а также степени их деградации приведены в Таблице 5.2.

В отличие от степени деградации белка как целого, деградация пептидов демонстрирует рН-зависимость (Таблица 5.2). Наиболее подверженными УФ-А-индуцированному W⁶²WCNDGR⁶⁸ I⁹⁸VSDGNGMNAWVAWR¹¹² пептилы И повреждению оказались (аминокислотные остатки TrpH в однобуквенной номенклатуре аминокислот обозначены как W). Данные пептиды демонстрируют наиболее высокие степени деградации при снижении рН раствора с противоположными изменениями: уменьшение и увеличение степени модификации первого и второго пептида, соответственно, с максимальным различием при рН 5, см. Таблицу 5.2. Другие пептиды демонстрируют меньшую степень деградации и умеренное влияние рН.

Масс-спектрометрические данные были проверены на наличие всех KNAH⁻⁻ сенсибилизированных модификаций белков и аминокислот, о которых сообщалось на сегодняшний день [24,25,28]: однократное и двукратное оксигенирование остатков MetSH и TrpH, кросс-сшивание через остатки TrpH и TyrOH, ковалентное присоединение KNAH⁻⁻, а также потеря массы 2.015 Да остатком триптофана в неизвестной реакции. Поиск ионов,

87

соответствующих данным модификациям, был произведен на основе рассчитанных масс, соответствующих модифицированным пептидам с различным зарядом. Все найденные модифицированные пептиды были подвергнуты MC/MC анализу. Ниже приведены подробные характеристики найденных пептидов; свод информации об обнаруженных модификациях представлен в Таблице 5.2.

Таблица 5.2. Пептиды, полученные с помощью трипсинолиза HEWL, степени их деградации при различных значениях pH и УФ-А-индуцированные модификации. Перечисленные данные представляют средние значения трехкратных измерений. Аминокислотные остатки ТугОН в однобуквенной номенклатуре аминокислот обозначены как Y.

Пептид	$[M+H^{\scriptscriptstyle +}]^{\scriptscriptstyle +}$	nH 3 1	$\frac{\Phi_{\text{deg}}}{\text{pH 4 9}}$	pH 7 4	УФ-А-индуцированные модификации
H ¹⁵ GLDNYR ²¹	874.4166	15 ± 5			Ковалентное присоединение КNAH к Y20 Кросс-сшивка: Y20-Y23
G ²² YSLGNWV CAAK ³³	1325.6306	7 ± 2	2 ± 1	6 ± 2	Кросс-сшивка: Y20–Y23, Y23–Y53 (2 изомера) Ковалентное присоединение KNAH к Y23
N ⁴⁶ TDGSTDY GILQINSR ⁶¹	1753.8351	9 ± 3	4 ± 1	13 ± 4	Кросс-сшивка: Ү23-Ү53 (2 изомера)
W ⁶² WCNDGR ⁶⁸	993.3995	29 ± 9	20 ± 6	39 ± 12	Однократное оксигенирование W62 (3 изомера) Однократное оксигенирование W62 с потерей 2 Да (2 изомера) Ковалентное присоединение KNAH к W62 (3 изомера) Кросс-сшивки: W62–W62 (2 изомера), W62– Y23
I ⁹⁸ VSDGNGM NAWVAWR ¹¹²	1675.8009	50 ± 15	78 ± 23	17 ± 5	Однократное оксигенирование W108 с потерей 2 Да Двукратное оксигенирование W108 и M105
G ¹¹⁷ TDVQAWI R ¹²⁵	1045.5425	11 ± 3	15 ± 5	13 ± 4	Потеря 2 Да W123 (2 изомера) Ковалентное присоединение KNAH [—] к W123

5.11. Оксигенирование остатков метионина и триптофана. Потеря молекулы воды оксигенированными формами TrpH

Аналогично работе [28], оксигенирование двух остатков MetSH в составе HEWL, M12 и M105 (аминокислотные остатки MetSH в однобуквенной номенклатуре аминокислот обозначены как М), было обнаружено до и после фотолиза при всех значениях pH. Отсутствие четкой корреляции количеств данных модификаций с дозами облучения, по-видимому, указывает на образование данных модификаций при хранении белков и/или подготовке образцов для MC-анализа.

Одно- и двукратное оксигенирование было обнаружено для пептидов, содержащих остатки W28, W62, W108 и W123. Большинство этих продуктов демонстрируют слабые сигналы до облучения и небольшой, практически независимый от pH, рост сигналов в массспектрах образцов после УФ-А фотолиза. Исключением являются (1) одно- и двукратно оксигенированные формы пептида I⁹⁸VSDGNGMNAWVAWR¹¹², каждая из которых элюируется в виде частично разрешенного широкого пика, а также (2) однократно оксигенированная форма $W^{62}WCNDGR^{68}$, элюирующаяся в виде двух отдельных пиков. Данные оксигенированные пептиды накапливались в наибольших количествах во время УФ-А фотолиза. MC/MC-спектры данных продуктов выявили необычную особенность: отсутствие сигналов от ионов W62(+O) и W108(+O), но высокоинтенсивные сигналы, соответствующие ионам W62(-2H) и W108(-2H); MC/MC-спектры однократно оксигенированных форм I⁹⁸VSDGNGMNAWVAWR¹¹² и W⁶²WCNDGR⁶⁸ показаны на Рис. 5.7 (А) и (Б), соответственно. MC/MC-спектры дважды оксигенированной формы I⁹⁸VSDGNGMNAWVAWR¹¹² показаны на Рис. П5.7 Приложения 9. Как и в работе [28], CID-фрагментация пептида W⁶²WCNDGR⁶⁸ в использованных условиях приводила к низкой интенсивности сигналов b-ионов, но высокой интенсивности сигнала иона у6, соответствующего немодифицированному W63, что однозначно подтверждает оксигенирование W62. Вторым оксигенированным остатком пептида I⁹⁸VSDGNGMNAWVAWR¹¹² является M105 (Рис. П5.7 Приложения 9).

МС-анализ также показал наличие ионов, соответствующих пептидам 98-112 и 62-68 с потерей массы 2.0156 Да (и +13.9792 Да в случае 98-112). Хроматограммы по выделенному ионному току для данных ионов хорошо совпадают с хроматограммами ионов для соответствующих пептидов с модификацией TrpH(+O), что показано на Рис. П5.8 (A-B) Приложения 9. МС/МС-спектры пептидов с потерей двух атомов Н (-2.0156 Да) практически идентичны MC/MC-спектрам пептидов с оксигенированными остатками TrpH, представленным на Рис. 5.7 (А) и (Б) (для прямого сравнения см. Рис. П5.7, П5.9, П5.10 Приложения 9). Сопоставимые интенсивности МС-сигналов ионов пептидов с модификациями TrpH(-2H) и TrpH(+O) осложняют поиск ответа на вопрос о том, какая из двух модификаций является прекурсором второй, образующейся при ионизации электрораспылением (electrospray ionization, ESI) в процессе MC-анализа. Следует отметить, что при ионизации электрораспылением оксигенирование пептидов является неэффективным процессом, который наблюдается только при элюции высоких концентраций пептидов с характерным отношением интенсивностей МС сигналов для исходных и оксигенированных пептидов > 1000:1. Можно предположить, что наличие ненасыщенного фрагмента в составе модификации TrpH(-2H) может предрасполагать данные пептиды к ESI-индуцированному оксигенированию, однако стоит отметить, что данный процесс не наблюдался ранее для пептидов с модификацией ТгрН(-2H), полученных для белка α-кристаллина как в режиме МС, так и МС/МС [24]. В то же время частичная фрагментация молекул является весьма распространенным явлением при регистрации МС-сигнала, что наиболее ярко может быть показано на примере фрагментации кросс-сшивок свободного TrpH [25]. Данные наблюдения, вместе с идентичными МС/МС-спектрами модификаций TrpH(-2H) и TrpH(+O), говорят в пользу того, что пептиды с модификацией TrpH(+O) являются

предшественниками ионов с TrpH(-2H), регистрируемых при получении MC-сигнала даже без CID-фрагментации.



IVSDGNGMNAW¹⁰⁸(+O)VAWR МС/МС-спектры пептидов (A) Рис. 5.7. с иономпредшественником m/z $[M+2H^+]^{2+}$ 846.4009, (Б) $W^{62}(+O)WCNDGR$ с ионом-предшественником m/z [M+2H⁺]²⁺ 505.2032, (B) GTDVQAW¹²³(+KNAH⁻)IR с ионом-предшественником m/z $[M+2H^+]^{2+}$ кросс-сшивки Y23-Y53 (GY²³SLGNWVCAAK) 616.8511 И **(**Γ) (NTDGSTD<u>Y⁵³GILQINSR</u>) с ионом-предшественником m/z [M+4H⁺]⁴⁺ 770.12. Синий и красный цвет соответствует ионам b и у, соответственно; оранжевый цвет на Рис. (В) соответствует ионам у' с потерей CO₂ фрагментом KNAH⁻⁻.

Модификация с потерей 2.0156 Да также была обнаружена для остатка W123 пептида G¹¹⁷TDVQAWIR¹²⁵ (см. MC/MC спектр на Рис. П5.11 Приложения 9), который элюировался в

виде двух пиков с отсутствием МС-сигналов от оксигенированных пептидов, Рис. П5.8 (Г) Приложения 9. Данное наблюдение можно объяснить или потерей молекулы воды пептидом G^{117} TDVOA(W+O)IR¹²⁵ с образованием G^{117} TDVOA(W-2H)IR¹²⁵, или же существованием термодинамически стабильной формы G¹¹⁷TDVQA(W-2H)IR¹²⁵ в растворе до ионизации. При этом стоит отметить, что если потеря воды оксигенированным пептидом происходит в растворе, то в хроматограмме ионов G^{117} TDVQA(W-2H)IR¹²⁵ можно было бы ожидать наблюдения четырех различных пиков. А именно, двух пиков от термодинамически стабильных пептидов G¹¹⁷TDVQA(W-2H)IR¹²⁵, образованных в растворе, и двух пиков от пептидов G^{117} TDVQA(W-2H)IR¹²⁵, образованных из ионов-предшественников G^{117} TDVQA(W+O)IR¹²⁵ и соответственно, имеющих другие значения RT, во время регистрации МС-сигнала (в предположении одинаковой эффективности потери воды фрагментами W62(+O) и W108(+O)). Однако наблюдение всего двух пиков в хроматограммах, скорее всего, указывает на правильность первого предположения, т.е. на существование только формы G¹¹⁷TDVQA(W+O)IR¹²⁵, практически полностью распадающейся с отщеплением молекулы H₂O в процессе ESI (два пика, вероятно, соответствуют двум диастереоизомерам).

Количества оксигенированных форм TrpH были оценены как суммы площадей, соответствующие пептидам с модификациями TrpH(+O) и TrpH(-2H), в предположении равной эффективности ионизации неповрежденных и модифицированных пептидов. pH-зависимость степени УФ-А-индуированного оксигенирования TrpH показана на Рис. 5.8(А).

При всех исследованных значениях pH значительная степень деградации HEWL обусловлена оксигенированием W108 с примерно трехкратным увеличением количества данной модификации при pH 4.9 по сравнению с другими pH. В используемых условиях механизм оксигенирования W108 включает окисление остатка W108 в реакции с ³KNAH⁻ с образованием Trp108[•] и его последующую реакцию с $O_2^{\bullet-}$, реакция 5.7, или O_2 , реакция 5.5. Таким образом, наблюдаемая pH-зависимость степени оксигенирования может быть связана с изменением зарядов ³KNAH⁻ и/или $O_2^{\bullet-}$ с отрицательных на нейтральные при протонировании этих частиц, pKa 3.7 [188] и 4.88 [38], соответственно. Следует отметить, что, так как W108 располагается в глубине полости отрицательно заряженного ферментативного центра HEWL [79,265], исчезновение кулоновского отталкивания между ферментативным центром и данными частицами может дополнительно способствовать проникновению и последующим реакциям обеих радикальных частиц с W108/Trp108[•].



Рис. 5.8. Количества модифицированных пептидов HEWL, образованных после 8 минут анаэробного УФ-А фотолиза при рН 3.1 (красный), рН 4.9 (зеленый) и рН 7.4 (синий), относительно их начального количества в необлученном образце. (А) Однократно оксигенированные формы HEWL, (Б) ковалентное присоединение KNAH[—] к HEWL и (В) кросс-сшивки HEWL.

Оксигенирование W62 вносит существенный вклад в модификацию HEWL только при pH 3.1 с незначительным оксигенированием при pH 4.9 и 7.2. Учитывая незначительные изменения количеств других модификаций W62, о которых будет рассказано далее в Разделах 5.12 и 5.13, именно модификация W62(+O), по-видимому, ответственна за наблюдаемое увеличение степени деградации пептида 62–68 при снижении pH от 4.9 до 3.1, см. Таблицу 5.2.

5.12. Ковалентное присоединение KNAH⁻⁻ к HEWL

Ранее ковалентное присоединение KNAH[—] к трём остаткам TrpH в составе HEWL было описано в работе [28] с подтверждением модификации MC/MC спектрами только для W62. В настоящей работе ковалентное присоединение KNAH[—] к остатку W123 было подтверждено соответствующим MC/MC спектром (Рис. 5.7 (В), детали приведены на Рис. П5.12 Приложения 9). Кроме того, в MC-данных были обнаружены сигналы ионов с m/z 1061.5685 и 1512.65704 [M+H⁺]⁺, соответствующие присоединению KNAH[—] к пептидам H¹⁵GLDNYR²¹ и

G²²YSLGNWVCAAK³³ соответственно. К сожалению, локализация связывания KNAH[—] в данных пептидах не была установлена из-за недостаточной интенсивности сигналов для MC/MC анализа. Предполагая, что KNAH[—] связывается с пептидами только через остатки TrpH/TyrOH, регистрацию сигнала от иона с m/z 1061.5685 [M+H⁺]⁺ можно рассматривать как первое экспериментальное свидетельство связывания KNAH[—] с остатками ТуrOH.

Обнаружено, что пептид W^{62} (+KNAH[—])WCNDGR⁶⁸ элюируется в виде трех пиков, причем два пика характеризуются значительно меньшей интенсивностью по сравнению с основным пиком, о котором сообщалось ранее (Рис. П5.13 Приложения 9) [28]. МС/МСспектры для двух из трех пиков (Рис. П5.14 Приложения 9) подтвердили присоединение КNАН[—] только к W62, что указывает на ковалентное связывание KNAH[—] через разные положения ароматической системы остатка TrpH. Стоит отметить, что в случае фотолиза TrpH в свободном состоянии [25] было зарегистрировано шесть различных форм аддуктов KNAH-Trp. Результаты настоящей работы показывают, что глобула HEWL значительно ограничивает разнообразие положений ковалентной связи между KNAH⁻ и TrpH, что приводит к образованию преимущественно одной формы (наиболее интенсивный пик на 17.1 мин, Рис. П5.13 Приложения 9). На данный момент установление положения связывания ароматических систем TrpH и KNAH[—] невозможно из-за недостаточного количества данных. Также была выявлена ранее неизвестная особенность CID-фрагментации пептидов, содержащих модификацию W(+KNAH⁻⁻). А именно, потеря CO₂-группы, которая увеличивает разнообразие b- и у-ионов в MC/MC спектрах (Рис. 5.7 (В) и П5.12, П5.14 Приложения 9). В дальнейшем данный факт может помочь в поиске ковалентного присоединения KNAH- к белкам, экстрагированным из возрастных и катарактальных хрусталиков.

Снижение pH раствора уменьшает количество обнаруженных пептидов с присоединением KNAH[—] в два раза (Рис. 5.8 (Б)). Данный факт не согласуется с общим увеличением сигнала от HEWL(+KNAH[—]), наблюдаемым при анализе целого белка (Рис. 5.6 (В)), что может указывать на увеличение разнообразия форм присоединения KNAH[—] к остаткам TrpH/TyrOH и, как следствие, снижению индивидуальных концентраций модификаций в условиях низких значений pH.

5.13. Образование TrpH- и TyrOH-содержащих кросс-сшивок HEWL

Y23-Y23, Помимо ранее описанных кросс-сшивок Y23-W62 И W62-W62 (соответствующие МС/МС-спектры идентичны приведенным в [28]), в настоящей работе были обнаружены ионы пептидов с m/z 2197.0238 и 3076.4423 [M+H⁺]⁺, которые можно отнести к Tyr(-H)OH-Tyr(-H)OH $(\text{HGLDNY}^{20}\text{R})$ (GY²³SLGNWVCAAK) кросс-сшивкам (GY²³SLGNWVCAAK) (NTDGSTDY⁵³GILQINSR). Сшивки данных пептидов имеют разницу масс -2.0157 Да по сравнению с суммой масс исходных пептидов, что указывает на образование ковалентной связи между пептидами в реакциях между радикалами. Значительное увеличение выхода ковалентного связывания между Y23 и Y53 при pH 3.1 (Рис. 5.8 (В)) позволило получить MC/MC-спектр двух изомеров данной модификации (см. Рис. 5.7 (Г) и П5.15 Приложения 9).

Следует отметить, что ранее ковалентное связывание между данными пептидами было обнаружено только между остатками W28 и W53 при фотоокислении HEWL [26,78] и окислении HEWL химическими реагентами [79]. Наблюдаемое увеличение количества Y23-Y53 при pH 3.1 (Рис. 5.8 (В)) указывает на возможность использования варьирования pH среды как способа увеличения выхода продуктов, образующихся в небольших количествах при физиологически значимых условиях, для дальнейшего установления их характеристик.

Снижение pH раствора приводит к значительному снижению (в 4–6 раз) выхода кросссшивок между остатками TrpH и одновременно увеличивает выход кросс-сшивок Tyr(-H)OH-Tyr(-H)OH (Puc. 5.8 (B)). Учитывая результаты SDS-ПААГ(15%)-электрофореза, Puc. 5.4, можно предположить, что межмолекулярные кросс-сшивки преимущественно образуются между остатками TrpH, а сшивки по остаткам ТуrOH, особенно в условиях низких pH, характерны для внутримолекулярных ковалентных связей. Последний вывод также согласуется с близким расположением остатков Y20, Y23 и Y53 внутри глобулы HEWL, что недавно было подтверждено с помощью молекулярно-динамического моделирования [79].

Стоит подчеркнуть, что с высокой долей вероятности большинство кросс-сшивок HEWL образуются в количествах ниже чувствительности MC анализа, поэтому данные на Рис. 5.8 (В) следует рассматривать как отражение тенденций, вызванных изменением pH, а не как представление абсолютных количеств образующихся кросс-сшивок.

Среди возможных причин наблюдаемого характера pH-индуцированнх изменений в повреждении HEWL можно выделить явление переноса электрона на большие расстояния внутри белковой глобулы (Long-Range Electron Transfer, LRET) от остатка ТугОН к Trp[•], реакция 5.9, см. Раздел 1.5.1. Во-первых, данный процесс может объяснять образование ТугОН-содержащих кросс-сшивок в условиях нейтрального значения pH раствора, при котором эффективность реакции ³KNAH⁻ с остатками ТугОН невысока (см. Рис. 5.1).

 $HEWL(TyrOH...Trp') \rightarrow HEWL(TyrO'...TrpH)$ (5.9)

В работе Weinstein и др. [219] было показано, что константа скорости LRET в HEWL существенно увеличивается при снижении pH от 9 и ниже, достигая максимума при pH 5.4 и демонстрируя снижение в сильно кислых средах. Данная зависимость k_{LRET} хорошо коррелирует с pH-зависимостью степени деградации W62 (Таблица 5.2), демонстрирующей минимум деградации пептида $W^{62}WCNDGR^{68}$ при pH 4.9. Вероятно, частичная репарация

радикалов Trp[•] с образованием TrpH в составе HEWL в реакции 5.9 может быть связана с ускорением LRET при данном значении pH.

Обсуждение и заключение по материалам главы 5

Полученные результаты демонстрируют существенное влияние белковой глобулы на исход радикальных реакций между KNAH[—] и TrpH/TyrOH при изменении pH по сравнению с реакциями между KNAH[—] и TrpH/TyrOH в свободном состоянии (Глава 4). Во-первых, было показано, что изменение pH оказывает незначительное влияние на константу скорости реакции ОПЭ (реакция 5.2) при частичном протонировании HEWL-Trp[•] при pH 3.1, хотя выводы Главы 4 давали основание предполагать увеличение этой величины в кислых условиях. Отсутствие изменений значения k_{оПЭ} при снижении pH от 4.9 до 3.1 (Таблица 5.1) указывает на нивелирование ускорения ОПЭ другими pH-индуцированными изменениями, например изменением доступности остатков TrpH/TyrOH для растворителя и/или изменением кулоновских взаимодействий между заряженными реагентами.

Во-вторых, было показано, что снижение pH от 7.2 до 4.9 приводит к смене основного пути деградации HEWL с межмолекулярной димеризации ($\Phi_{dim} \approx \frac{1}{2} \Phi_{deg}$ при pH 7.2, Таблица 5.1) на образование внутримолекулярных модификаций с доминированием оксигенирования остатков TrpH (Puc. 5.6 (B) и 5.8 (A), $\Phi_{deg} \gg \Phi_{dim}$ при pH 4.9, Таблица 5.1). Наблюдаемое резкое изменение итоговых продуктов радикальных реакций может быть обусловлено двумя явлениями: (1) замедлением димеризации HEWL, реакция 5.8, из-за повышения общего положительного заряда молекулы белка при низком значении pH [249,265] и (2) увеличением константы скорости реакции между O_2^{--} и HEWL-Trp⁺, реакция 5.7, при протонировании O_2^{--} с образованием гидропероксильного радикала HO₂⁺ при pH < pKa(HO₂⁺) = 4.88 [38,269], что было установлено экспериментально, см. Раздел 5.4. Таким образом, принимая во внимание результаты Главы 4, можно сделать вывод, что для радикальных реакций TrpH и TyrOH, находящихся в составе белковой глобулы, наблюдается повышение конкуренции между реакциями димеризации и образования оксигенированных форм. В настоящей работе результатом данной конкуренции является крайне высокая чувствительность состава продуктов повреждения HEWL к изменению pH среды.

Измерение константы скорости реакции димеризации HEWL-Trp[•] (5.8) в настоящей работе было невозможным из-за быстрой гибели радикалов в реакциях 5.2, 5.3, 5.6 и 5.7. В настоящее время в литературных источниках отсутствуют сведения о значениях констант скорости димеризации HEWL[•] при значениях pH < 7, при этом косвенное подтверждение замедления димеризации при низких значениях pH содержится в работе Furuta и др. [Furuta08]. Следует отметить, что значения константы скорости димеризации при рH \approx 7, (1–6)·10⁶ M⁻¹c⁻¹

[266,268], указывают на кинетический контроль данной реакции, т.е. на бо́льшую важность взаимной ориентации радикалов, нежели диффузионного движения молекул. Таким образом, предполагаемое уменьшение константы скорости реакции 5.8 при низких значениях pH, повидимому, обусловлено уменьшением вероятности возникновения взаимной ориентации белковых глобул, необходимой для образования ковалентной связи между радикальными центрами Trp[•].

Также было установлено, что УФ-А фотосенсибилизированное повреждение HEWL как при pH 4.9, так и при 7.4 приводит к одинаковой потере ферментативной активности HEWL (Рис. 5.3), несмотря на разный характер модификаций белка. При нейтральном рН снижение ферментативной активности HEWL, вероятно, связано со значительными стерическими затруднениями и блокированием ферментативных центров HEWL в составе димерных форм, преимущественно связанных через остатки W62, которые находятся на входе в каталитической щели белка. Значительная степень оксигенирования W108, находящегося в глубине каталитической щели белка, частично способствует инактивации HEWL при pH 4.9. Неожиданным последствием УФ-А повреждения HEWL при рН 3 является отсутствие изменений его ферментативной активности (Рис. 5.3) по сравнению с неповрежденным белком, несмотря на значительную степень оксигенирования остатков W62 и W108. Хотя окислительные модификации, как правило, и считаются наиболее опасными для ферментативной активности белков, результаты настоящей работы показывают, что сочетание определенных модификаций может оказывать незначительное влияние на итоговую ферментативную активность поврежденного HEWL.

МС-анализ продуктов повреждения HEWL показал, что оксигенированные остатки TrpH крайне легко подвергаются фрагментации в процессе ионизации электрораспылением, что может указывать на низкую термостабильность данных модификаций. Данная особенность даёт основания предполагать, что именно оксигенированные формы TrpH являются источником модификации -2 Да для остатков TrpH, ранее найденной среди продуктов УФ-А-индуцированного повреждения белка α-кристаллина [24]. Стоит отметить, что подобные ненасыщенные продукты TrpH не наблюдались среди продуктов фотоповреждения TrpH в свободном состоянии (Глава 4, [25]). Вероятно, модифицированные остатки TrpH(-2H) могут быть стабилизированы большими белковыми комплексами, подобными α-кристаллинам, предотвращая их последующую деградацию во время хранения и подготовки образца к МС-анализу. Если данное предположение верно, то медленное превращение остатков TrpH(+O) в TrpH(-2H) можно ожидать и в составе крупных комплексов белков хрусталика глаза *in vivo*. Таким образом, оксигенированные формы TrpH с последующей потерей H₂O могут выступать в роли центров дальнейших модификаций белков хрусталика.

ГЛАВА 6. ДИСПРОПОРЦИОНИРОВАНИЕ И ДИМЕРИЗАЦИЯ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

Предыдущие исследования [25,28] и Глава 5 настоящей работы показали, что фотосенсибилизированный фотолиз TrpH и TrpH-содержащих белков в присутствии KNAHприводит к образованию продукта ковалентного присоединения (сшивки) KNAH⁻ к TrpH с брутто-формулой нейтрально заряженной частицы KNAH-Trp, см. Схему 1.12, Раздел 1.5.4. Данная сшивка была обнаружена в следовых количествах в случае свободной аминокислоты [25] и в значительно повышенных количествах в случае белков ([28], Глава 5 настоящей работы) и свободного ТгрН в растворах повышенной вязкости (10-40 сП) [243]. Предполагается, что, аналогично ранее упомянутому ковалентному связыванию Куп с белками хрусталика человеческого глаза, Раздел 1.3.2.2, ковалентное связывание KNAH⁻ с TrpH может быть естественной ПТМ белков. Известно, что связывание Куп с пептидами значительно усиливает его фотосенсибилизирующую способность (см. Раздел 1.4.2), что, как предполагается, ускоряет накопление необратимых повреждений белков хрусталика глаза под действием УФ-излучения [270]. Фотохимические свойства остатка KNAH[—] в составе сшивки КNАН-Тгр в настоящее время неизвестны. Установление механизма образования KNA-Тгр могло бы прояснить возможное накопление данных продуктов в живых тканях, где обновление белков происходит крайне медленно или не происходит вовсе, например, в хрусталике человеческого глаза.

Предполагаемым механизмом образования сшивки KNAH-Trp является реакция рекомбинации радикала KNAH[—] с потерей атома H, KNA^{•—}, с Trp[•], которая приводила бы к образованию нейтрально заряженного продукта KNAH-Trp, см. Схему 1.12, Раздел 1.5.4. Однако реакции, приводящие к образованию KNA^{•—}, в настоящее время неизвестны. Предполагается, что одним из их возможных источников может быть реакция ³KNAH[—] с основным состоянием KNAH[—], т.е. реакция диспропорционирования KNAH[—] под действием УФ-излучения. Подобные реакции УФ-индуцированного диспропорционирования триплетных состояний известны для кетонов, а именно для ацетона [271] и 6,7,8-триметиллюмазина [272].

6.1. Предполагаемая схема реакций

В отсутствие тушителей реакции ³KNAH[—] включают триплет-триплетную аннигиляцию, реакция 6.1 [185,273], перенос энергии электронного возбуждения на O_2 с генерацией 1O_2 , реакция 6.2 [174,274], и предполагаемое диспропорционирование KNAH[—], реакция 6.3:

Реакции 6.1 и 6.2 характеризуются высокими константами скорости, около 2·10⁹ М⁻¹с⁻¹ [24,185]. Реакция диспропорционирования 6.3 не была описана в предыдущих исследованиях, что, по-видимому, связано с низким значением константы скорости, затрудняющей наблюдение данного процесса на фоне быстрых реакций 6.1, 6.2. Для минимизации вклада реакций 6.1 и 6.2 в настоящем исследовании эксперименты проводились в анаэробных условиях, при низких значениях энергии лазерного импульса.

6.2. Установление механизма УФ-индуцированного диспропорционирования KNAH-

Кинетические кривые ТА были зарегистрированы на длине волны 590 нм, максимуме поглощения ³KNAH[—] [185], при различных концентрациях KNAH[—] и двух значениях энергии лазерного импульса (около 1 и 3 мДж). Скорость гибель ³KNAH[—] увеличивается с увеличением концентрации KNAH[—], что подтверждает существование предполагаемой реакции 6.3; кинетические кривые, зарегистрированные для буферных и небуферных растворов, приведены на Рис. 6.1 (А) и П6.1 Приложения 10.

Кинетические кривые, приведенные на Рис. 6.1 (А), не могут быть описаны моноэкспоненциальной функцией из-за вклада быстрой бимолекулярной реакции 6.1. Для получения наиболее точных значений константы скорости реакции 6.3, k_q, кинетические кривые были аппроксимированы схемой реакций, включая бимолекулярную реакцию триплет-триплетной 6.2 6.3, аннигиляции с константой ktt И псевдомономолекулярные реакции И характеризующиеся обобщённой константой скорости мономолекулярной гибели kobs, kobs= k_{O2}·C(O₂) + k_q·C(KNAH⁻); детали аппроксимации приведены в Приложении 11. Линейная аппроксимация зависимости kobs от C(KNAH⁻⁻) (Рис. 6.1 (Б)) позволила получить значение kq = $(6.7 \pm 1.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ и $(6.0 \pm 1.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ для буферных и небуферных водных растворов, соответственно. Низкие значения полученных констант скорости указывают на кинетический контроль реакции 6.3 с незначительным влиянием ионной силы раствора на механизм реакции. Величина k_q в 40 раз меньше значений $k_{tt} = 2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ (определена в настоящей работе, см. Таблицу Пб.1 Приложения 12) и $k_{O2} = 2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ [24], что согласуется с отсутствием сообщений об этой реакции в предыдущих работах [185,273] по причине её малого вклада в гибель ³КNАН⁻⁻.

Для получения спектра оптического поглощения радикала KNA^{•–}, образующегося в реакции 6.3, были зарегистрированы кинетические кривые TA в спектральном диапазоне 270–650 нм. На Рис. 6.1 (В) приведены спектры TA для различных временных задержек после импульса лазера.



Рис. 6.1. (А) Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на длине волны 590 нм после лазерного облучения (355 нм, 1 мДж/импульс) растворов КNAH[—] в различных концентрациях при pH 7.4 в 150 мМ PBS. Гладкие кривые получены при аппроксимации экспериментальных кривых схемой реакций 6.1–6.3. (Б) Зависимости наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) от концентрации KNAH[—] в небуферном водном растворе (H₂O) (красный цвет), буферном растворе, содержащим 150 мМ PBS (черный цвет), и небуферном водном растворе (D₂O) (серый цвет) при pH \approx 7. (В) Спектры TA, зарегистрированные при облучении (355 нм, 5 мДж/импульс) 1.6 мМ раствора KNAH[—] в небуферном водном растворе при pH 7.4 в анаэробных условиях при различных временных задержках после лазерного импульса. Вставка: остаточные спектры TA того же образца в меньшем масштабе. (Г) Спектр TA, соответствующий 30 мкс после облучения лазерным импульсом (355 нм, 5 мДж) небуферного водного раствора 1.6 мМ KNAH[—] при pH 7.4 (черный цвет), и спектр KNAH²·[—] (серый цвет, взят из [188]).

Быстрый спад полосы поглощения с максимумом на 590 нм, соответствующий гибели ³КNAH[—], приводит к появлению долгоживущих частиц с максимумом поглощения на 380 нм и плечом на 480 нм (см. вставку на Рис. 6.1 (В)); кинетические кривые TA, соответствующие данным длинам волн, представлены на Рис. П6.2 Приложения 13. Следует отметить, что радикал KNAH₂^{•—}, характеризующийся широкой полосой поглощения с максимумом на 510 нм (см. Рис. 6.1 (Г), [25,188]), в условиях C(O₂) = 10–15 мкМ [25] имеет характерное время гибели ок. 30 мкс (см. кинетические кривые TA на Рис. П6.2 (Б) Приложения 13) и не наблюдается в остаточном спектре TA.

Образовавшийся О₂^{•−} поглощает излучение в УФ-диапазоне (максимумом спектра поглощения на 240 нм [38]), поэтому не вносит вклада в наблюдаемые спектры ТА. Рис. 6.1 (Г) демонстрирует явные различия в форме спектров поглощения частиц KNAH₂^{•−} и KNA^{•−},

99

которые могут быть использованы для идентификации различных радикалов KNAH[—] в дальнейших оптических исследованиях.

Глава 3 настоящей работы показывает, что дезактивация ³KNAH[—] может проходить по двум различным механизмам: последовательному РСЕТ-механизму, характерному для реакции ³KNAH[—] с TrpH, или по механизму HT, характерному, для реакции ³KNAH[—] с NTyrOH при pH 7. Как и в случае реакции с аминокислотами, механизм реакции УФ-индуцированного диспропорционирования может быть определен по величине КИЭ для константы скорости k_q .

Величина k_q в D₂O была получена аналогично процедуре, описанной выше для измерения k_q в H₂O; соответствующие кинетические кривые TA приведены на Рис. Пб.1 (Б) Приложения 10 и зависимость $k_{obs}(C(KNAH^{-}))$ – на Рис. 6.1 (Б). Полученное значение k_q в D₂O равно (1.7 ± 1.0)×10⁷ M⁻¹c⁻¹, что приводит к значению КИЭ = 3.5, характерному для механизма HT.

6.3. Димеризация KNAH[—] под действием УФ-А излучения

Для исследования дальнейших реакций KNAH₂^{•-} и KNA^{•-} были проведены эксперименты с длительным УФ-А облучением водных растворов KNAH⁻⁻ с использованием двух источников излучения: импульсного лазерного излучения и непрерывного излучения ртутной лампы. Основным отличием данных источников является мгновенная концентрация образующихся радикалов, которую можно оценить на уровне 5 и 10⁻³ мкМ в случае лазера и ртутной лампы, соответственно.

На Рис. 6.2 (А) показана динамика изменения концентрации KNAH[—] во время УФ-А фотолиза, определенная с помощью ВЭЖХ-УФ-анализа облученных образцов. В случае импульсного лазерного излучения линейность теряется на ранних стадиях фотолиза, что указывает на большой вклад вторичной фотохимии, т. е. фотоиндуцированных процессов с участием первично образованных фотопродуктов. Квантовые выходы фотодеградации KNAH[—] были оценены по линейным участкам динамик и показали значения $\Phi_{deg} = 1.7 \pm 0.3$ % и 0.009 ± 0.002 % для облучения лазером и лампой, соответственно. Низкие значения Φ_{deg} свидетельствуют о высокой эффективности рекомбинации образующихся радикалов KNAH₂^{•—} и KNA^{•—} с образованием исходных реагентов в реакциях 6.4 и 6.5:

$$KNAH_2^{\bullet-} + KNA^{\bullet-} \rightarrow 2 KNAH^-$$
(6.4)

$$KNA^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow KNAH^- + O_2$$
(6.5)

Хроматограммы образцов, зарегистрированные по поглощению на 330 нм (см. Рис. 6.2 (Б)), свидетельствуют о различном составе продуктов, образующихся при облучении двумя источниками.



Рис. 6.2. (А) Изменение концентрации КNAH[—] относительно начального значения C(KNAH[—])₀ в водных растворах 0.5 мМ KNAH[—] при pH 7.0 при анаэробном УФ-А фотолизе под действием лазерного импульсного излучения (355 нм, 10 Гц, 1 мДж/импульс) и излучения ртутной лампы (350–380 нм, 6.6·10¹⁷ фотонов/с). Прямые линии соответствуют временно́му участку деградации KNAH[—] в первичных фотореакциях. (Б) Хроматограммы, зарегистрированные по поглощению на 330 нм для образцов 0.5 мМ KNAH[—] в небуферных водных растворах до (черный цвет) и после анаэробного УФ-А фотолиза с помощью лазерного импульсного облучения (20 минут, красный цвет) и стационарного облучения лампы (80 минут, синий цвет). (В) Масс-спектры пяти основных димеров KNAH[—], зарегистрированные с помощью ВЭЖХ-УФ-МС и обозначенные как (i)-(v) на рисунках (Б) и (В).

Идентификация образовавшихся продуктов была проведена с помощью ВЭЖХ-МС анализа (см. детали на Рис. Пб.3 Приложения 13). Данный анализ показал, что пики основных продуктов с RT (i) 14.3, (ii) 15.3, (iii) 15.6, (iv) 16.1 и (v) 17.2 мин, Рис. 6.2 (Б), представляют собой димеры KNAH[—] с m/z 377.1 [M+H⁺]⁺, Рис. 6.2 (В). На Схеме 6.1 Приложения 13 приведена предлагаемая структура одного из димеров KNAH[—] и возможные пути его фрагментации при получении масс-спектра. Стоит отметить, что данные димерные формы образуются только под действием лазерного импульсного облучения, что указывает на источник их образования в бимолекулярных реакциях комбинации KNA^{•—} по разным положениям ароматических систем, реакция 6.6:

$$KNA^{\bullet-} + KNA^{\bullet-} \rightarrow [димер KNAH^{-}]_i, i=1-5$$
 (6.6)

101

Нелинейное накопление данных димеров с выходом на плато на более поздних стадиях фотолиза (Рис. Пб.4 Приложения 13) указывает на их фотохимическую активность и, скорее всего, участие во вторичной фотохимии, что и обусловливает быструю потерю линейности динамики распада KNAH[—] в условиях импульсного лазерного облучения, Рис. 6.2 (А). В МС спектрах не было обнаружено каких-либо сигналов, соответствующих оксигенированным формам KNAH[—], что указывает на образование этих продуктов в количествах ниже порога чувствительности используемого масс-спектрометра.

Основные продукты, образующиеся при стационарном облучении лампой, с RT 18.8, 19.3 и 21.1 мин, не были идентифицированы с помощью MC анализа ввиду отсутствия MC сигналов. Данные продукты монотонно накапливаются в ходе фотолиза с использованием обоих источников излучения (см. Рис. П6.5 Приложения 13), что указывает на их повышенную фотохимическую инертность по сравнению с димерами KNAH[—]. Спектры поглощения всех упомянутых продуктов приведены на Рис. П6.4 и П6.5 Приложения 13.

Заключение по материалам главы 6

Результаты, описанные в Главе 6 настоящей работы, подтверждают существование реакции диспропорционирования между триплетным и основным состояниями KNAH[—]. К сожалению, полученных данных недостаточно для того, чтобы определить положение отщепления H от KNAH[—], однако, учитывая преобладание кето-формы основного состояния KNAH[—], (квантово-химические расчеты, [202]) атом H, скорее всего, отщепляется от NH-группы кето-таутомера KNAH[—].

Рекомбинация KNA^{•-} с образованием димеров, по-видимому, является относительно медленным процессом по сравнению с димеризацией Trp[•] [106]. В предыдущих исследованиях [25] и Главе 4 настоящей работы лазерный импульсный фотолиз TrpH в присутствии KNAH⁻⁻ приводил к значениям Φ_{deg} (TrpH) ок. 10–20 % и образованию димеров TrpH в качестве доминирующих продуктов. В настоящей же работе аналогичное доминирование димеров KNAH⁻⁻ среди фотопродуктов KNAH⁻⁻ и почти десятикратное снижение Φ_{deg} (KNAH⁻⁻) по сравнению с Φ_{deg} (TrpH) можно использовать для грубой оценки константы скорости реакции 6.6 как k₆ $\approx 5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$, что в 10 раз ниже константы скорости димеризации Trp[•] [106].

Обнаруженная реакция комбинации KNA^{•—} с образованием димеров KNAH[—] даёт основания для предположения аналогичного механизма образования сшивок KNAH-Trp. Данный механизм образования KNAH-Trp из KNA^{•—} также может хорошо объяснить изменения в выходах этих продуктов в случае свободных аминокислот [25] и белков (Глава 5 настоящей работы). Константа скорости реакции диспропорционирования, k_q, достаточно мала, поэтому выход KNA^{•—} зависит, в том числе, от скорости конкурирующих реакций ³KNAH[—].

По-видимому, повышенный выход сшивок KNAH-Trp в случае белков по сравнению со случаем свободного TrpH объясняется повышенным выходом KNA^{•—} вследствие более медленной реакции ³KNAH[—] с белками. Кроме того, более медленная скорость димеризации Trp[•] в составе белков также может способствовать увеличению выхода KNAH-Trp в реакциях Trp[•] и KNA^{•—}.

Следует подчеркнуть, что фотоиндуцированное диспропорционирование KNAH[—] может эффективно протекать только в анаэробных условиях с очень низким содержанием O₂, как, например, в ткани хрусталика глаза человека (1–2 мкM O₂ в центральной части и 40 мкM на периферии хрусталика [161]). Наличие O₂ приводит к восстановлению основного состояния KNAH[—] в реакции O₂ с ³KNAH[—], а также в реакции O₂^{•—} с KNA^{•—}, реакция 6.5. Таким образом, наличие O₂ значительно уменьшает образование радикалов кинуреновой кислоты, перенаправляя путь окисления в сторону реакций, опосредованных ¹O₂ и O₂^{•—}.

Следует отметить, что в здоровом хрусталике KNAH[—] присутствует в следовых количествах – 1–2 мкМ/мг с увеличением до 8-10 мкМ/мг при прогрессировании катаракты [186]. Из-за низкого содержания KNAH⁻⁻ В хрусталике, фотоиндуцированное диспропорционирование является крайне маловероятным процессом. Более того, в природных условиях поток излучения из окружающей среды и диффузия радикалов внутри упорядоченной среды ткани значительно ниже по сравнению с условиями, использованными в настоящей работе. Учитывая присутствие природных восстановителей, таких как глутатион, в относительно высоких концентрациях внутри тканей [140], можно ожидать эффективное восстановление KNA[•] до KNAH⁻ *in vivo*. Кроме того, аналогично быстрым реакциям между $O_2^{\bullet-}$ и Trp'/TyrO[•], можно ожидать быструю реакцию KNA^{•-} с $O_2^{\bullet-}$, реакция 6.5. Принимая во внимание вышеперечисленные факторы, образование димеров KNAH⁻ в хрусталике человека следует считать крайне маловероятным.

Следует также отметить, что спектр поглощения KNA^{•—} (Рис. 6.1 (Г)) имеет характерную особенность со спектром продукта, образующегося в реакции между KNAH[—] и HO[•] [202], что может указывать на образование одних и тех же радикалов в двух процессах. Используя методы квантово-химических расчетов, авторы работы [202] рассмотрели три различных механизма реакции между KNAH[—] и HO[•], включая отрыв атома H от KNAH[—] с образование радикального аддукта, что требует экспериментального подтверждения, чего не было проведено в указанной работе. Однако сходство спектров частиц, образующихся в разных реакциях, указывает на возможное образование KNA^{•—} в реакциях без участия света, что указывает на необходимость экспериментального подтверждения межанизма реакции между KNAH[—] и HO[•]. Возможность одноэлектронного окисления KNAH[—] может дать подсказку к

пониманию механизмов нейронной и антиоксидантной активности KNAH[—], о которой было сообщено ранее (см. Раздел 1.4.4). Таким образом, результаты Главы 6 могут быть полезны для дальнейших исследований реакций с участием кинуреновой кислоты в живых системах.

ГЛАВА 7. МЕХАНИЗМ И ПРОДУКТЫ РЕАКЦИИ МЕЖДУ РАДИКАЛОМ ТРИПТОФАНА И СУПЕРОКСИД-АНИОНОМ

Как было отмечено в обзоре литературы (см. Раздел 1.5.3 Главы 1), несмотря на значимость быстрой реакции между Trp[•] и $O_2^{\bullet-}$ с константой скорости $1.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ [75], информация о выходе продуктов TrpH в данной реакции противоречива. Данная глава настоящей работы посвящена исследованию реакции между Trp[•] и $O_2^{\bullet-}$ с помощью фотохимического метода генерации Trp[•] и $O_2^{\bullet-}$ с использованием KNAH⁻ в качестве фотосенсибилизатора. Способность KNAH₂^{•-} быть генератором $O_2^{\bullet-}$ показана ранее в работах [25,28]. Учитывая биологическую распространенность KNAH⁻, в том числе в хрусталике глаза человека, который подвергается солнечному УФ-А излучению, KNAH⁻ может вносить вклад в образование $O_2^{\bullet-}$ и, как следствие, в образование других АФК (см. Раздел 1.1.2), которые могут вступать в реакции с белками хрусталика и приводить к их необратимой модификации.

Основным преимуществом подхода, отличающего настоящую работу от ранних, является непосредственная регистрация кинетики как радикальных короткоживущих частиц, так и исходных реагентов с помощью метода лазерного импульсного фотолиза. Комбинация анализа кинетических кривых гибели радикалов и анализа конечных продуктов с помощью ВЭЖХ-УФ-МС анализа позволяет провести более детальное исследование реакции Trp[•] и O₂^{•-} и, возможно, найти причины существующего противоречия между результатами, полученными при использовании различных методов генерации радикалов.

7.1. Схема реакций и выбор условий эксперимента

Генерация целевых радикалов (Trp[•] и O₂^{•—}) и их последующие реакции могут быть описаны в виде следующей схемы (в настоящей работе в качестве производного TrpH был использован N-ацетил-триптофан, NTrpH):

3 KNAH ⁻ + NTrpH \rightarrow KNAH ₂ ·- + NTrp·	(7.1)
$\text{KNAH}_2^{\bullet-} + \text{NTrp}^{\bullet} \rightarrow \text{KNAH}^- + \text{NTrpH}$	(7.2)
$\mathrm{KNAH_2}^{\bullet-} + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{KNAH}^- + \mathrm{O_2}^{\bullet-}$	(7.3)
$\mathrm{NTrp}^{\bullet} + \mathrm{O_2}^{\bullet-} + \mathrm{H}^+ \longrightarrow \mathrm{NTrpH} + \mathrm{O_2}$	(7.4)
$\mathrm{NTrp}^{\bullet} + \mathrm{O_2}^{\bullet-} + \mathrm{H}^+ \to \mathrm{NTrpOOH}$	(7.5)
NTrp⁺ + NTrp⁺ → NTrp-NTrp	(7.6)

Константа скорости реакции Trp[•] и O₂^{•--}, 1.2·10⁹ M⁻¹c⁻¹, полученная в работе [75], отражает сумму двух потенциальных путей данной реакции, обозначенных здесь как 7.4 и 7.5. Как видно из схемы реакций, для эффективной генерации O₂^{•--} необходимо доминирование

реакции 7.3 над 7.2 что было достигнуто с помощью использования малых интенсивностей лазерного излучения и высоких концентраций O₂. При использовании лазерных импульсов с энергией в диапазоне 3-10 мДж, концентрация генерируемых радикалов варьировалась в пределах 20-70 мкМ, что было на два порядка ниже $C(O_2) = 1.4$ мМ [252] в условиях непрерывного барботирования кислорода через раствор. В используемых условиях KNAH₂^{•-} превращается в O₂^{•-} за время менее 1 мкс, что приводит к образованию эквимолярной смеси NTrp[•] и O₂^{•-}. Стоит отметить, что при исследовании реакций 7.4 и 7.5 методом импульсного радиолиза начальная концентрация O₂^{•-} в 3-4 раза превышала начальную концентрацию Trp[•] [75,232]. Не исключается, что данные условия могли приводить к последующим реакциям избытка O₂^{•-} с первичными продуктами радикальных реакций и, как следствие, к ошибочной интерпретации итогов радиолиза.

Необходимо также отметить, что при аэробных условиях часть ³KNAH[—] реагирует с O₂ с высокой константой скорости $2.3 \cdot 10^9$ M⁻¹c⁻¹ [24] и образованием синглетного кислорода [174,274], реакция 7.7:

$${}^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{O}_{2} \rightarrow \text{KNAH}^{-} + {}^{1}\text{O}_{2}$$

$$(7.7)$$

Для минимизирования вклада нежелательной реакции 7.7, снижающей выход целевых радикалов, основная часть экспериментов проводилась в условиях избытка по концентрации NTrpH, C(NTrpH) = 10 мM = 7·C(O₂). Важно отметить, что реакция 7.7 обладает высоким выходом ¹O₂ (около 40 % [174,274]), способного реагировать с основными состояниями как KNAH⁻⁻, так и NTrpH. В то же время ¹O₂ является нестабильной частицей со временем жизни в водном растворе при pH 7 около 2 мкс ($k_{pacnaдa} = 5 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$) [275]. Реакция между ¹O₂ и TrpH может протекать по механизму физической или химической дезактивации ¹O₂ с близкими значениями констант скорости около $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ для каждого механизма [13,276], реакции 7.8 и 7.9. При этом только химический механизм дезактивации приводит к образованию оксигенированных продуктов TrpH, реакция 7.9.

$$NTrpH + {}^{1}O_{2} \rightarrow NTrpH + O_{2}$$
(7.8)

$$NTrpH + {}^{1}O_{2} \rightarrow NTrpOOH$$
(7.9)

Используя значения констант скорости, приведенные в литературе, была оценена эффективность конверсии ³KNAH[—] в оксигенированные продукты NTrpH в реакциях 7.7 и 7.9 при выбранных условиях, которая составила величину < 4% от исходного количества ³KNAH[—]; детали оценки приведены в Приложении 14. Следует отметить, что константа скорости реакции KNAH[—] с ¹O₂ в настоящее время неизвестна. Однако, учитывая отсутствие сообщений об образовании оксигенированных продуктов KNAH[—] при аэробном фотолизе KNAH[—] в отсутствии иных тушителей ³KNAH[—] [25], можно сделать вывод, что при использовании низких

концентраций KNAH[—] (0.3 мМ), её реакция с ${}^{1}O_{2}$ протекает медленно и дает незначительный вклад в количество образующихся продуктов. В целом, при выбранных экспериментальных условиях вклад ${}^{1}O_{2}$ в изучаемые реакции считался незначительным и не учитывался при дальнейшем рассмотрении.

7.2. Восстановление основных состояний реагентов в радикальных реакциях

7.2.1. Восстановление NTrpH

Для получения ответа на вопрос о соотношении каналов 7.4 и 7.5 в реакции между NTrp[•] и $O_2^{\bullet-}$ были зарегистрированы кинетические кривые гибели NTrp[•] и восстановления NTrpH. Наиболее удобная область длин волн для регистрации кинетики восстановления NTrpH – это область рядом с максимумом поглощения триптофана, около 280 нм, ε_{280} (TrpH) = 5500 M⁻¹cm⁻¹ (см. Рис. 1.1 Раздела 1.1.2). Важно отметить, что использование миллимолярных концентраций NTrpH затрудняет регистрацию изменений концентрации вещества из-за высокой оптической плотности раствора на 280 нм и делает невозможным запись кинетики при концентрациях NTrpH > 2 мМ и оптическом пути 1 см. Для обеспечения эффективной регистрации кинетики NTrpH до 2 мМ и (2) использования кварцевой кюветы с малой длиной оптического пути (2 мм). Кинетические кривые TA в диапазоне длин волн 260-620 нм были зарегистрированы после облучения лазерным импульсом (3 мДж, 355 нм) раствора 2 мМ NTrpH и 0.3 мМ KNAH⁻ в условиях барботирования раствора кислородом. Спектры TA, соответствующие различным временным задержкам после лазерного импульса, приведены на Рис. 7.1 (A).

Сигналы ТА, наблюдаемые в диапазоне длин волн 370–620 нм при временной задержке 0.4 мкс после лазерного импульса, представляют суперпозицию спектров поглощения NTrp' и KNAH₂^{•–}. Спектры поглощения данных частиц характеризуются максимумами на 510 и 520 нм, соответственно, см. Рис. 1.5 (Б) и (В). В более коротковолновой области 260-370 нм сигнал ТА имеет отрицательные значения с максимумами полос на 280 и 330 нм, отражающие выгорание NTrpH и KNAH[–], соответственно. Быстрое исчезновение KNAH₂^{•–} в реакции 7.3 отражено в спектре на Рис. 7.1 (А) как резкое уменьшение начального сигнала ТА на 510 нм в течение первой микросекунды после образования ³KNAH[–]. Последующая медленная гибель NTrp' на шкале в десятки микросекунд обусловлена бимолекулярными реакциями 7.4-7.6. Эволюция спектра ТА на Рис. 7.1 (А) показывает, что к 150 мкс после лазерного импульса сигнал на длине волны 510 нм полностью исчезает. При этом динамика отрицательного сигнала на 280 нм, соответствующая выгоранию NTrpH, практически не изменяется по сравнению с начальным значением, что отражает отсутствие значительного восстановления NTrpH на той же временной

шкале. В совокупности, данные наблюдения свидетельствуют о высоком выходе продуктов NTrpH в реакциях 7.5 и 7.6.



Рис. 7.1. (А, Б) Спектры промежуточного поглощения, зарегистрированные с разной задержкой после импульса лазера (355 нм, 20 мДж) для растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 2.0 мМ NTrpH в 30 мМ PBS при pH 7.0 в условиях барботирования раствора (А) кислородом и (Б) аргоном. (В, Г) Кинетические кривые промежуточного поглощения, зарегистрированные на 280 и 510 нм после облучения лазерным импульсом (355 нм, 20 мДж) растворов 0.3 мМ KNAH[—] и 2.0 мМ NTrpH в 30 мМ PBS при pH 7.0 в условиях барботирования растворов 0.3 мМ кNAH[—] и 2.0 мМ NTrpH в 30 мМ PBS при pH 7.0 в условиях барботирования растворов 0.3 мМ кNAH[—] и 2.0 мМ NTrpH в 30 мМ PBS при рН 7.0 в условиях барботирования растворов (А) кислородом и (Б) аргоном.

В анаэробных условиях основным путем гибели NTrp[•] является его реакция с KNAH₂^{•–}, приводящая к эффективному восстановлению NTrpH и KNAH[–], реакция 7.2, при этом димерные формы NTrpH, образующиеся с квантовым выходом около 19% [25], являются основными продуктами фотолиза (Раздел 4.3 Главы 4). В аэробных условиях димеризация NTrp[•] протекает с той же константой скорости, что и в анаэробных условиях. Таким образом, различия между аэробными и анаэробными условиями преимущественно обусловлены различиями в кинетике и продуктах реакций 7.2 и 7.4, 7.5.

Для сравнения эффективности восстановления NTrpH в аэробных и анаэробных условиях спектры TA для раствора 2 мМ NTrpH и 0.3 мМ KNAH[—] были также зарегистрированы в условиях барботирования раствора аргоном, Рис. 7.1 (Б). Разительное отличие в форме спектров, а именно, более высокие значения сигнала TA, обусловлены поглощением радикала KNAH²^{•—}, который обладает большим временем жизни в анаэробной среде. В отсутствии кислорода гибель NTrp[•] и KNAH²^{•—} в реакциях 7.2 и 7.6 сопровождается
уменьшением сигнала ТА до практически нулевых значений во всем наблюдаемом спектре, Рис. 7.1 (Б). Отсутствие выгорания NTrpH указывает на то, что димерные формы, образующиеся в достаточно высоких количествах (реакция 7.6, см. Главу 4), не дают существенного вклада в изменение поглощения на 280 нм в силу близости их спектров поглощения к исходному NTrpH [25]. Сравнение кинетических кривых ТА на 280 и 510 нм в аэробных и анаэробных условиях, см. Рис. 7.1 (В) и (Г), показывает, что радикал NTrp[•] быстро гибнет как в присутствии, так и отсутствии кислорода в растворе, тогда как NTrpH быстро восстанавливается в анаэробных условиях в реакции 7.2 и практически не восстанавливается в аэробных условиях. Данные особенности указывают на существенный вклад реакции образования продуктов NTrpH, отличных от димеров, т.е. реакции 7.5.

Как и в случае NTrpH, эволюция спектра ТА дает возможность регистрации кинетики восстановления основного состояния KNAH⁻ по поглощению вещества на длине волны 330 нм, состояния KNAH⁻⁻. советующей максиму поглощения основного Спектр TA, зарегистрированный через 0.4 мкс после поглощения лазерного импульса в анаэробных условиях, четко отражает начальное выгорание KNAH⁻ на фоне спектров поглощения радикалов, Рис. 7.1 (Б). Последующее уменьшение выгорания сигнала ТА на 330 нм указывает на восстановление KNAH[—] в реакции 7.2. В аэробных условиях восстановление KNAH[—] протекает значительно быстрее, Рис. 7.1 (A), в силу реакции KNAH₂[•] с кислородом, реакция 7.3. Более детальное рассмотрение остаточных сигналов в спектре ТА (Раздел 7.2.2), зарегистрированном в аэробных условиях, выявило неожиданную особенность: даже после быстрой гибели KNAH₂[•] в реакции 7.3 форма спектра ТА всё ещё демонстрирует небольшой «провал» на 330 нм, характерный для выгорания КNAH⁻⁻, что означает неполное восстановление KNAH[—] в реакции 7.3 даже после 150 мкс после импульса лазера.

7.2.2. Восстановление KNAH-

Следует отметить, что быстрое исчезновение KNAH₂^{•−} в реакции с O₂ не доказывает образования O₂^{•−}. Наиболее убедительным доказательством образования O₂^{•−} может быть прямая регистрация O₂^{•−} на длине волны, соответствующей максимуму поглощения частицы, 240 нм. К сожалению, экспериментальная установка, использованная в настоящей работе, не позволяет регистрировать сигналы TA в дальней области УФ излучения. Кроме того, в используемых условиях прямая регистрация O₂^{•−} на 240 нм будет затруднена вкладами в итоговое промежуточное поглощение от множества других частиц, а именно радикалов и основных состояний KNAH[−] и NTrpH. В данной ситуации не прямым доказательством образования O₂^{•−} может быть регистрация восстановления KNAH[−] как продукта, сопровождающего образование O₂^{•−} в реакции 7.3.

Для получения более детальной информации о долгоживущих остаточных сигналах, которые ранее не были приняты во внимание, был зарегистрирован спектр ТА в аэробных условиях с использованием повышенной концентрации NTrpH (10 мМ). Высокие концентрации NTrpH делают невозможным регистрацию сигналов в области 260-310 нм, однако увеличивают значения ТА для диапазона 310-620 нм в силу увеличения выхода радикалов в реакции 7.1 и уменьшения вклада от реакции 7.7. Тем самым, увеличивается сигнал/шум для получаемых ТА спектров, что позволяет делать более точные выводы об исследуемых процессах. Эволюция итогового спектра ТА представлена на Рис. П7.1 (А) Приложения 14. Наблюдаемое уменьшение амплитуды сигнала ТА в диапазоне 440-600 нм согласуется с динамикой, полученной для 2 мМ раствора NTrpH.

Согласно предложенной схеме реакций 7.1-7.6, сигнал ТА, наблюдаемый в области 315-600 нм после быстрого исчезновения $KNAH_2^{\bullet-}$, должен соответствовать только поглощению радикала NTrp[•]. Для установления присутствия сигналов от других частиц и кинетики выгорания $KNAH^-$ из полученного спектра ТА был вычтен спектр поглощения Trp[•], известный из литературных источников [65,189,190]. Итоговый спектр вычитания приведен на Рис. 7.2 в единицах $\Delta\Delta A$.



Рис. 7.2. Эволюция разностного спектра промежуточного поглощения (∆∆А), полученная путем вычитания спектра поглощения Trp[•], взятого из [65,189], из спектров TA, приведенных на Рис. П7.1 (А) для случая аэробного фотолиза KNAH[—] в присутствии 10 мМ NTrpH. Вставка: те же данные в меньшем масштабе.

Стоит отметить, что при вычитании спектра Trp[•] было сделано предположение, что NTrp[•] вносит основной вклад в сигнал TA в диапазоне длин волн 400–600 нм. Поэтому при вычитании был использован спектр поглощения Trp[•] с максимально допустимой амплитудой при условии, что данная амплитуда не превышает экспериментальных значений сигнала TA в

области 400-600 нм. Амплитуды спектра Trp[•], выбранные для вычитания, приведены на Рис. П7.1 (Б).

Спектр вычитания на Рис. 7.2 отражает быстрое исчезновение KNAH₂⁻⁻ и столь же быстрое восстановление большей части KNAH⁻⁻ менее чем за одну микросекунду после лазерного импульса. Однако дальнейшая эволюция сигнала ΔΔА на Рис. 7.2 (Вставка) демонстрирует присутствие сигнала выгорания KNAH⁻⁻ и долгоживущих частиц с поглощением в области длин волн 450-550 нм. Следует подчеркнуть, что в данной области могут поглощать и другие частицы, ³KNAH⁻⁻ и KNAH₂⁻⁻, однако при выбранных условиях характерные времена жизни этих частиц составляют 0.04 мкс и 0.36 мкс, соответственно. Данный факт свидетельствует о том, что NTrp⁺ является не единственной радикальной частицей, поглощающей в диапазоне видимого света и присутствующей в растворе после гибели KNAH₂⁺⁻. Примечательно, что наблюдаемый остаточный сигнал в диапазоне 440–600 нм имеет пик, точно соответствующий пику полосы поглощения KNAH₂⁺⁻, 520 нм, Рис. 1.5 (Б). Однако, учитывая тот факт, что перекрытие спектров поглощения различных частиц является распространенным явлением, отнесение этого сигнала к KNAH₂⁺⁻ требует дальнейшего подтверждения.

Неполное восстановление KNAH⁻⁻, наблюдаемое на Рис. 7.2, свидетельстует о существовании альтернативного канала гибели KNAH₂^{•--}, отличного от реакции 7.3. К сожалению, количественная оценка эффективности восстановления KNAH⁻⁻ и сопряженной с ней генерации $O_2^{\bullet--}$ по изменению величины ΔA_{330} невозможна по причине отсутствия информации о коэффициентах экстинкции продуктов, образующихся в результате альтернативной реакции KNAH₂^{•--}, а также продуктов, образующихся в реакции 7.5. Таким образом, эффективность генерации $O_2^{\bullet--}$ из KNAH₂^{•--} в аэробных условиях следует устанавливать с помощью иных подходов.

7.3. Поиск схемы радикальных реакций

Простейшим объяснением неполного восстановления $KNAH_2^{\bullet-}$ в реакции 7.3 может являться наличие конкурирующих реакций $KNAH_2^{\bullet-}$, например, с основными состояниями $KNAH^-$ и TrpH. Однако результаты предыдущих исследований $KNAH^-$ -индуцированного повреждения TrpH в анаэробных условиях ([25,28] и Главы 4 и 5 настоящей работы), не обнаружили сколь-либо заметных процессов, которые могли бы конкурировать с реакцией между O_2 и $KNAH_2^{\bullet-}$ и давать существенный вклад в наблюдаемую динамику при аэробных условиях. Таким образом, возможное объяснение наблюдаемых эффектов следует искать среди альтернативных реакций радикала $KNAH_2^{\bullet-}$ с кислородом, т.е. реакций, отличных от реакции переноса электрона.

Для установления природы реакции между $KNAH_2$ ⁻ и O_2 был получен набор кинетических кривых TA на 510 и 390 нм, соответствующих максимумам поглощения NTrp[•] и образующихся продуктов, см. Рис. 7.2. Кинетические кривые были получены при различных концентрациях O_2 в растворе, а именно 1.4 и 0.28 мM, соответствующих насыщению водного раствора кислородом и воздухом.

Первая попытка аппроксимации кинетических кривых ТА на 510 нм была проведена с помощью первоначально предполагавшейся схемы радикальных реакций, 7.1-7.6, используя известные значения их констант скорости (Глава 4, [75,232]). Расчётные кривые показали, что расчётная скорость гибели радикалов NTrp[•] в этом случае значительно выше экспериментальной см. сравнение расчетной и экспериментальной кривой на Рис. П7.2 Приложения 14). Это различие позволяет сделать два важных вывода. Во-первых, о наличии недостатка $O_2^{•-}$, что согласуется с выводами Раздела 7.2 о существовании альтернативного канала реакции 7.3. Во-вторых, о том, что частицы, образующиеся в результате альтернативного канала реакции 7.3, обладают малой реакционной активностью по отношению к NTrp[•] по сравнению с $O_2^{•-}$, т.е. эти продукты реагируют с NTrp[•] с константой скорости менее $1.2 \cdot 10^9 \, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$.

Предположение об обратимости реакции между KNAH2^{•-} и O₂, реакция 7.10, могло являться наиболее простым объяснением наблюдаемых процессов:

$$\text{KNAH}_2^{\bullet-} + \text{O}_2 \rightleftarrows \text{KNAH}^- + \text{H}^+ + \text{O}_2^{\bullet-} \quad (7.10)$$

Возможность такого равновесия может быть предположена в силу двух фактов. Во-первых, известно, что многие ароматические соединения, содержащие, как и KNAH⁻⁻, хинолиновый фрагмент, способны захватывать O_2^{*-} с константами скорости реакций вплоть до $1\cdot10^9$ M⁻¹c⁻¹ [277]. Во-вторых, способность KNAH⁻⁻ захватывать O_2^{*--} была показана экспериментально [200], хотя константа скорости данной реакции не была установлена. Однако наблюдаемая медленная гибель NTrp^{*} указывает на отсутствие в растворе высокореакционного KNAH^{2,*-}, концентрация которого могла бы поддерживаться силу равновесия 7.10. Кроме того, для выявления существования равновесия 7.10 были проведены эксперименты по аэробному фотолизу KNAH⁻⁻ и NTrpH при различных концентрациях KNAH⁻⁻. В случае существования равновесия 7.10 увеличение C(KNAH⁻⁻) должно приводить к смещению равновесия в сторону увеличения KNAH^{2,*--} и увеличению скорости гибели радикалов NTrp^{*}. Однако полученные результаты показали отсутствие какого-либо влияния C(KNAH⁻⁻) на кинетику гибели радикалов NTrp^{*} (данные не приведены). Таким образом, реакция 7.10 была исключена из дальнейшего рассмотрения.

Недавнее исследование [278] механизма реакции 7.1 между ³KNAH⁻ и TrpH/TyrOH методом XПЯ показало, что продуктами данной реакции являются частицы KNAH₂^{•-} в двух

таутомерных формах – кето- и оксо-хинолинатной. Данный факт дает основание предполагать, что именно существование двух форм $KNAH_2^{\bullet-}$, $K1^{\bullet-}$ и $K2^{\bullet-}$, проявляющих различную реакционную активность по отношению к O₂, обусловливает существование альтернативного механизма реакции между $KNAH_2^{\bullet-}$ и O₂. В качестве потенциальных моделей можно рассмотреть два предельных случая, см. Альтернативные схемы A1 и A2, Таблица 7.1.

Таблица 7.1. Альтернативные схемы Л	A1 1	4 A2	радикальных	реакций
-------------------------------------	------	------	-------------	---------

Схема А1	Схема А2			
$^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{NTrpH} \rightarrow \text{K1}^{\bullet-}/\text{K2}^{\bullet-} + \text{NTrp}^{\bullet-}$ (7.1)				
$K1^{\bullet-} + NTrp^{\bullet} \rightarrow KNAH^{-} + NTrpH$ (7.2.K1)				
$K2^{\bullet-} + NTrp^{\bullet} \rightarrow KNAH^{-} + NTrpH$ (7.2.K2)				
$K1^{\bullet-} + O_2 \rightarrow KN$	(7.3.K1)			
	$K2^{\bullet-} + O_2 \rightleftarrows K2OO^{\bullet-}$			
$K2^{\bullet-}$ + O_2 → медленно (7.3. $K2$)	(7.3.K2.f) f – forward (\rightarrow)			
	(7.3.K2.b) b – backward (\leftarrow)			
	NTrp [•] + K2OO [•] \rightarrow медл	иенно (7.4.А2)		

Реакции 7.4, 7.5 (реакции между NTrp' и O_2^{-}) и 7.6 (димеризация NTrp') остаются в Схемах A1 и A2 без изменений. В предлагаемых Схемах лишь один из таутомеров KNAH₂⁻⁻, K1⁺⁻, способен быстро превращаться в KNAH⁻⁻ (реакция 7.3.K1). Принципиальное различие схем A1 и A2 состоит в различных свойствах таутомера K2⁺⁻ в реакции с O₂. В Схеме A1 реакция 7.3.К2 является достаточно медленной (< 10^8 M⁻¹c⁻¹) и в предельном случае может быть исключена из рассмотрения при анализе кинетических кривых TA. В Схеме же A2 допускается существование реакции между K2⁺⁻ и O₂ в обратимом равновесии 7.3.К2.f и 7.3.К2.b. Так как наряду с переносом электрона одним из наиболее распространенных механизмов реакций между органическими радикалами, R⁺, и O₂ является образование ковалентной связи между двумя частицами с образованием пероксильных радикалов, ROO⁺, было предположено, что неизвестным продуктом реакции K2⁺⁻ и O₂ в Схеме A2 является пероксильный радикал K2OO⁺⁻.

Следует отметить, что в обеих схемах таутомеры K1^{•—} и K2^{•—} не были связаны быстрым равновесием, так как в противном случае быстрое превращение K2^{•—} в K1^{•—} приводило бы к эффективной генерации O₂^{•—} и полному восстановлению KNAH[—] в реакции 7.3.K1. Схемы A1 и A2 имеют два ключевых преимущества в объяснении экспериментальных кинетических кривых TA по сравнению со многими другими альтернативными схемами, предложенными в

ходе анализа данных ТА. Во-первых, данные схемы объясняют наличие вклада поглощения $KNAH_2^{\bullet-}(K2^{\bullet-})$ в сигнал ТА в области длин волн 450-550 нм (Рис. 7.2, Раздел 7.2.2). В Схеме A1 сохранение $K2^{\bullet-}$ обусловлено отсутствием его реакции с O₂, а в Схеме A2 – обратимым образованием $K2^{\bullet-}$ в реакции 7.3.К2.b. Во-вторых, данные схемы могут объяснить относительно низкую скорость гибели NTrp[•], наблюдаемую в эксперименте. А именно, в Схеме A1 данная особенность может быть объяснена низкой реакционной активностью $K2^{\bullet-}$ не только по отношению к O₂, но и к NTrp[•] в реакции 7.2.К2. В Схеме A2 медленная скорость гибели NTrp[•] объясняется низкой скоростью реакции NTrp[•] с K2OO^{•-}, реакция (7.4.А2).

Системы дифференциальных уравнений, соответствующие схемам A1 и A2, не имеют аналитического решения, поэтому в обоих случаях решение было найдено численно. Для упрощения аппроксимации кинетических кривых TA был введён параметр R (%) = 100% × $C_0(K1^{\bullet-}) / (C_0(K1^{\bullet-}) + C_0(K2^{\bullet-}))$, отражающий долю K1^{•-} среди начального количества KNAH₂^{•-}. Различные значения параметра R в диапазоне 0–100 % были зафиксированы и проверены на согласованность с кинетическим данными. Примечательно, что не все проверенные значения R приводят к согласию между экспериментальными и расчетными данными, а также реалистичным значениям искомых величин. Так, для обеих схем наилучшее согласие между расчетными и экспериментальными кривыми было получено при R = 50%.

Искомыми величинами системы в случае Схемы А1 были значения $\varepsilon_{510}(K1^-), \varepsilon_{510}(K2^-), k(7.2.K2), C_0(K1^-)$ и C_0(K2⁻⁻), при этом C_0(NTrp⁺) = C_0(K1⁻⁻) + C_0(K2⁻⁻). Детали аппроксимации представлены в Приложении 15. Аппроксимация дала следующие усредненные значения искомых параметров: $\varepsilon_{510}(K1^{--})=3100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \varepsilon_{510}(K2^{--})=200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и k(7.2.K2) = $3.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. Для иллюстрации соответствия расчетных величин экспериментальным данным были построены расчетные кривые, приведенные на Рис. П7.3 (А), (Б) Приложения 15. Таким образом, Схема А1 предполагает, что K2⁻⁻ характеризуется значительно более низкой константой скорости ОПЭ по сравнению с соответствующей константой для K1⁻⁻, $3.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ и 2.1·10⁹ M⁻¹c⁻¹, соответственно. Данный факт не согласуется с высокой эффективностью восстановления KNAH⁻⁻ и NTrp⁺ в анаэробных условиях ([25] и Глава 4 настоящей работы), что является существенным недостатком Схемы А1. Кроме того, значения соотношения C₀(NTrp⁺)_{кислород} / C₀(NTrp⁺)_{воздух}, полученные в данной схеме, лежат в диапазоне 0.75-0.80 (см. Рис. П7.3 (В)), что существенно отличается от значения 0.9, ожидаемого в используемых экспериментальных условиях.

Искомыми величинами системы в случае Схемы А2 были значения $\varepsilon_{510}(K1^{\bullet-}) = \varepsilon_{510}(K2^{\bullet-})$, k(7.3.K2.f), k(7.3.K2.b), C₀(K1^{•-}) и C₀(K2^{•-}), при этом C₀(NTrp[•]) = C₀(K1^{•-}) + C₀(K2^{•-}). Детали аппроксимации представлены в Приложении 16. Примечательно, что хорошее согласие между расчётными и экспериментальными кинетическими кривыми ТА в случае насыщения

раствора воздухом может быть получено при фиксировании значения k(7.4.A2) равным нулю. Однако все попытки аппроксимации кинетических кривых ТА при насыщении раствора кислородом продемонстрировали явное улучшение качества расчетных кривых с увеличением значения k(7.4.A2) до величин (0.8-4)·10⁸ М⁻¹с⁻¹. Поскольку Схема А2 содержит большое количество искомых параметров, поиск решения был произведен с использованием следующего упрощения: значения $\varepsilon_{510}(K2^{\bullet-}) = \varepsilon_{510}(K1^{\bullet-})$ и k(7.4.A2) были зафиксированы как параметры со значениями в диапазонах 1000-3000 М⁻¹см⁻¹ и (0.8-4)·10⁸ М⁻¹с⁻¹, соответственно. Оставшиеся неизвестные, k(7.3.K2.f), k(7.3.K2.b) и C₀(NTrp[•]), свободно варьировались в процессе аппроксимации. Качество результатов аппроксимации оценивалась по трем критериям. Первым критерием являлось отсутствие/минимальная зависимость рассчитанных констант скорости k(7.3.K2.f) и k(7.3.K2.b) от C₀(NTrp[•]) и C(O₂). Вторым критерием являлась близость соотношения $C_0(NTrp^{+})_{KUC,NDDOI} / C_0(NTrp^{+})_{BO3IVX}$ к теоретическому значению 0.9. Третьим критерием являлось стремление суммы квадратов отклонений между экспериментальными и расчетными данными к минимальным значениям. Путем систематического подбора значений $\epsilon_{510}(K2^{-}) = \epsilon_{510}(K1^{-})$ и k(7.4.A2) решение, в наибольшей степени соответствующее указанным критериям, было найдено при значениях $\varepsilon_{510}(K2^{\bullet-}) = \varepsilon_{510}(K1^{\bullet-}) = 2400 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ и k(7.4.A2) = 3.3·10⁸ М⁻¹с⁻¹. Аппроксимация кинетических кривых ТА при фиксировании этих значений дает усредненные значения k(7.3.K2.f) и k(7.3.K2.b), равные 1.8·10⁹ М⁻¹с⁻¹ и 5.4·10⁵ с⁻¹, соответственно. Для иллюстрации соответствия расчетных величин экспериментальным данным были построены расчетные кривые, приведенные на Рис. П7.4 (А), (Б) Приложения 16.

Применение Схемы A2 показало два существенных преимущества по сравнению со Схемой A1. Во-первых, сохранение сходства физических (ε₅₁₀) и химических (реакции 7.2.К1 и 7.2.К2) свойств К1^{•-} и К2^{•-}. Во-вторых, близость соотношения C₀(NTrp[•])_{кислород} / C₀(NTrp[•])_{воздух} к теоретическому значению 0.9.

Следует отметить, что два таутомера KNAH₂·-, (I·-) и (II·-), обнаруженные с помощью метода XIIЯ с временным разрешением [278], образуются в разных соотношениях в зависимости от аминокислоты, реагирующей с ³KNAH-. Например, реакция ³KNAH- с NTyrOH, протекающая по механизму HT, приводит к соотношению $C_0(I^{--}):C_0(II^{--}) \approx 1:1$, тогда реакция с NTrpH приводит к $C_0(I^{--}):C_0(II^{--}) \approx 8:1$. В настоящем исследовании аппроксимация экспериментальной кинетики TA разными схемами показала, что допустимое соотношение $C_0(K1^{--}):C_0(K2^{--})$ лежит в диапазоне от 1:1 до 2.3:1, причем наиболее надежные результаты получены при $C_0(K1^{--}):C_0(K2^{--}) \approx 1:1$. Причина расхождения между результатами, полученными двумя методами, неясна. Возможной причиной искажения расчетных параметров в настоящей работе является некоторое отклонение значений констант скорости, приведенных в литературных источниках, от констант процессов, наблюдаемых в настоящих экспериментах.

Например, значения констант скорости реакций между Trp' и O₂^{•-} [75] и димеризации двух Trp' [106] были измерены для растворов со значениями ионной силы, отличными от значения, использованного в настоящей работе. В свою очередь, выходы радикальных таутомерных форм, определенные с помощью метода XПЯ, могли быть искажены из-за того, что реакционная способность (I^{•-}) и (II^{•-}) в их геминальной рекомбинации с NTrp' принималась равной в случае обоих таутомеров. Однако, если один из таутомеров рекомбинирует с NTrp' в радикальной клетке более эффективно, то оценка его начального количества может быть завышена по сравнению с реальной величиной.

Используя Схему А2 как наиболее удовлетворяющую описанию экспериментальных данных для 510 нм, была проанализирована кинетика сигнала ТА, зарегистрированного на длине волны 390 нм. Первым шагом анализа кинетических кривых на 390 нм было построение расчетных кривых гибели NTrp' с использованием параметров, найденных при анализе кинетических кривых TA на 510 нм и значения $\varepsilon_{390}(Trp^{-})$, известного из литературы. Сравнение расчетной и экспериментальной кривой показывает существенное расхождение между ними (Рис. П7.5 (А) Приложения 17). Вычитание расчетной кривой из экспериментальной, Рис. П7.5 (А) Приложения 17, демонстрирует два важных факта. Во-первых, после быстрого и полного исчезновения К1⁻ и исчезновения большей части К2⁻ из раствора поглощение NTrp[•] составляет основную долю сигнала ТА на 390 нм. Это означает, что, как и на 510 нм, поглощение К2^{•-} на 390 нм не вносит существенного вклада в сигнал ТА. Во-вторых, кинетические кривые, полученные с помощью вычитания, имеют форму, характерную для кинетики промежуточной частицы (интермедиата) с участками, отражающими начальное накопление (до 10 мкс) и последующую гибель неизвестной частицы. Поскольку данные интермедиаты появляются по мере исчезновения NTrp' в быстрых радикальных реакциях, то можно предположить, что обнаруженные вещества являются продуктами NTrp¹. Так как димеры NTrpH не поглощают излучение на 390 нм [25], данные интермедиаты, по-видимому, следует отнести к продукту реакции 7.5. В предыдущих работах [75,232], результаты которых свидетельствовали о протекании реакции между Trp' и O₂'- по механизму присоединения, предполагалось, что непосредственным продуктом данной реакции является С3-гидропероксид ТгрН, ТгрООН, см. Схему 1.11 Раздела 1.5.3. Существование данной частицы не было доказано экспериментально. Считается, что ТгрООН является короткоживущим интермедиатом, мономолекулярные реакции которого приводят к образованию конечных продуктов TrpH, см. Раздел 1.5.3. Учитывая данные факты, кинетические кривые ТА на 390 нм были аппроксимированы Схемой А2, дополненной следующими реакциями:

NTrp' + O_2 ' \rightarrow NTrpOOH (7.5.A2) NTrpOOH \rightarrow продукты NTrpH (7.6.A2) Стоит отметить, что в данной схеме реакции 7.4 и 7.5 были заменены реакцией 7.5.А2, таким образом, выход NTrpOOH в реакции между NTrp[•] и $O_2^{•-}$ был принят за 100 %. Процедура аппроксимации описана в Приложении 17. Усредненные значения параметров, найденных с помощью аппроксимации, составляют: $\varepsilon_{390}(K1^{•-}) = 2150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{390}(K2^{•-}) = 690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{390}(NTrpOOH) = 540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, и k(7.6.А2) = $4.0 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$. Важно отметить, что значение k(7.6.А2) не зависит от C₀(NTrp[•]), что подтверждает предположение о мономолекулярном механизме последующих реакций TrpOOH. Для иллюстрации согласия найденных параметров с экспериментальными данными расчетные кривые были построены с использованием усредненных значений констант, см. Рис. П7.5 (Б), (В) Приложения 17.

Важно отметить, что образование ТгрООН также предполагается для другой биологически важной реакции ТгрН, реакции между ТгрН и ¹O₂ [236]. Однако, как показал анализ литературных источников, для данной реакции также не было получено прямых доказательств образования ТгрООН и кинетических характеристик реакций данного интермедиата. Результаты настоящей работы, возможно, являются первыми прямыми доказательствами существования интермедиата ТгрООН, хотя и не позволяют однозначно установить спектр поглощения данной короткоживущей частицы.

7.4. Распад реагентов при УФ-А-фотолизе

Согласно расчётам, сделанным на основе Схемы А2, почти половина первоначально образовавшегося количества NTrp[•] исчезает в реакциях с O₂^{•—} (реакции 7.4 и 7.5), а другая половина исчезает в реакции 7.6 с образованием димеров NTrpH. Для определения соотношения реакций 7.4 и 7.5 представляется удобным введение понятия выхода распада триптофана в реакциях его радикала, F_{deg}:

$$F_{deg}(NTrpH) = N_{deg}(NTrpH) / N(NTrp^{\bullet})$$
(7.11),

где $N_{deg}(NTrpH)$ – количество деградировавших молекул NTrpH, а $N(NTrp^{•})$ – суммарное количество радикалов NTrp[•], образованных в растворе за определенное время облучения. Значение $F_{deg}(NTrpH)$ может быть получено из значений $\Phi_{deg}(NTrpH)$ с помощью коэффициента, характеризующего эффективность конверсии поглощенных квантов света в NTrp[•]. Эффективность этой конверсии определяется квантовым выходом ³KNAH⁻ (82% [185]) и эффективностью дезактивации ³KNAH⁻ аминокислотой NTrpH (реакция 7.1) в условиях конкуренции с O₂ (реакция 7.7).

Для получения значений $\Phi_{deg}(NTrpH)$ был проведен УФ-А фотолиз NTrpH в аэробных условиях, с использованием лазерного импульсного излучения. Для установления влияния $C_0(NTrp^{\bullet})$ и $C(O_2)$ на значения $\Phi_{deg}(NTrpH)$ были использованы различные энергии лазерных импульсов (3 и 6 мДж) и концентрации кислорода ($C(O_2) = 1.4$ мМ и 280 мкМ). На Рис 7.3

представлены динамики распада NTrpH и KNAH[—] при анаэробном фотолизе водных растворов 10 мМ NTrpH и 0.3 мМ KNAH[—]. Значения $\Phi_{deg}(NTrpH)$ были рассчитаны как N_{deg}(NTrpH)/N_{погл.кв.}, где N_{deg}(NTrpH) – количество деградировавших молекул NTrpH и N_{погл.кв.} – количество поглощенных квантов, соответствующие определенной дозе поглощенного излучения, см. детали расчётов в Главе 2, Раздел 2.7. Полученные значения $\Phi_{deg}(NTrpH)$ приведены в Таблице 7.2.

Полученные значения $\Phi_{deg}(NTrpH)$ существенно превышают значения $\Phi_{deg}(NTrpH)$ для анаэробных условий, о которых сообщалось в работе [25] и Главе 4 настоящей работы, что отражает факт быстрой деградации триптофана в аэробных условиях и указывает на заметный вклад реакции 7.5 в гибель NTrp[•].



Рис. 7.3. Изменение концентраций KNAH[—] и NTrpH относительно своих начальных значений (C_0) при УФ-А фотолизе 0.3 мМ KNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH в 30 мМ PBS при барботировании растворов (А) кислородом, $C(O_2) = 1.4$ мМ, и (Б) воздухом, $C(O_2) = 280$ мкМ. Каждая точка отражает среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трех независимых экспериментах.

$C(\Omega_2)$	Φ _q (NTrpl	H) / %	Fdeg(NTrpH) / %		
	3 мДж	6 мДж	3 мДж	6 мДж	
1.4 мМ	53.4 ± 10.7	55.2 ± 11.0	76.8 ± 15.4	79.4 ± 15.9	
280 мкМ	55.4 ± 11.1	55.8 ± 11.2	71.4 ± 14.3	71.8 ± 14.4	

Таблица 7.2. Значения $\Phi_{deg}(NTrpH)$ и $F_{deg}(NTrpH)$.

Значения $F_{deg}(NTrpH)$, представленные в Таблице 7.2, были рассчитаны с использованием значений $\Phi_{deg}(NTrpH)$ и коэффициентов эффективности конверсии квантов света в NTrp[•], которые составляют 0.70 для условий $C(O_2) = 1.4$ мМ и 0.78 – для $C(O_2) = 280$ мкМ. При насыщении раствора кислородом значение $F_{deg}(NTrpH)$ составляет 77-79 %, при использовании воздуха – 71-72 %. Следует отметить, что полученные значения $F_{deg}(NTrpH)$ ниже 100 %, что указывает на существование канала восстановления NTrp[•] в NTrpH. В Схеме

A2, предложенной на основе анализа кинетических данных (Раздел 7.3), такими каналами могут быть реакции между K1^{•—}/K2^{•—} с NTrp[•] (7.2.K1 и 7.2.K2) и реакция между O₂^{•—} и NTrp[•], реакция 7.4.

Полное восстановление KNAH[—] в результате импульсного фотолиза, обнаруженное в настоящей работе (см. Рис. 7.3), также наблюдалось ранее при стационарном фотолизе растворов KNAH[—] и NTrpH в условиях преобладания реакции 7.3 над 7.2 [25]. Среди всех условий фотолиза, использованных в настоящей работе, заметная деградация KNAH[—] наблюдалась только в случае фотолиза с энергией импульса лазера 6 мДж и барботировании раствора воздухом, $F_{deg}(KNAH[—]) = 0.7 \pm 0.1$ %. Для других условий оценка $F_{deg}(KNAH[—])$ была невозможна по причине незначительной деградации KNAH[—] при выбранных дозах облучения.

7.5. Накопление продуктов УФ-А-фотолиза

ВЭЖХ-УФ-анализ облученных образцов показал наличие множества продуктов NTrpH фотохимического происхождения, см. Рис. 7.4.



Рис. 7.4. Хроматограммы, зарегистрированные по поглощению на (А) 240 нм и (Б) 280 нм, для проб, отобранных из водных растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH до (черный цвет) и после (красный цвет) УФ-А фотолиза с энергией лазера 6 мДж/импульс при барботировании раствора кислородом. Оксигенированные формы NTrpH указаны на панели (А), а димерные формы (di(i), i = 1-6) – на панели (Б).

Качественный состав обнаруженных продуктов практически не зависит от C(O₂), C(NTrpH) и C₀(NTrp[•]) (данные не приведены). Для проведения ВЭЖХ-УФ-МС-анализа продуктов был использован раствор с низким содержанием C(NTrpH) (2 мМ), чтобы избежать подавления ионизации продуктов избытком исходного NTrpH. С помощью ВЭЖХ-УФ-МСанализа были обнаружены те же группы продуктов NTrpH, что ранее были обнаружены при КNАН[—]-сенсибилизированном анаэробном фотолизе (работа [25] и Глава 4 настоящей работы): однократно и дважды оксигенированные формы NTrpH и различные димеры NTrpH (diNTrpH).

Среди оксигенированных продуктов NTrpH три формы NTrpH(+2O) имеют наиболее интенсивные MC и УФ сигналы с RT 14.5, 17.8 и 18.7 мин, см. Рис.7.4 (А). Спектр поглощения продукта с RT 17.8 соответствует спектру NNFK, который является наиболее представленным продуктом деградации NTrpH для всех исследованных условий фотолиза. Две другие формы NTrp(+2O) характеризуются спектрами поглощения, схожими со спектром N-ацетил-3 α -гидропероксипирроиндола (NHPPI) [235], см. структуру на Схеме 1.10. Наблюдение двух форм NHPPI согласуется с существованием цис- и транс-изомеров NHPPI, о которых сообщалось в предыдущих исследованиях [236,279]. По порядку элюирования цис- и транс-изомеров, выявленных в предыдущих исследованиях, в настоящей работе пики с RT 14.5 и 18.7 мин можно отнести к транс- и цис-NHPPI соответственно. На поздних стадиях фотолиза скорость накопления NHPPI несколько замедляется, что указывает на его участие во вторичных фотохимических процессах.

В качестве дополнительного доказательства принадлежности этих пиков гидропероксидам NTrpH, были использованы два подхода. Первый метод заключался в инкубации смеси продуктов при повышенных температурах, второй – в добавлении к смеси продуктов восстановителя (NaBH₄). Было показано, что две формы NTrpH(+2O) с RT 14.5 и 18.7 мин легко восстанавливаются NaBH4 и демонстрируют повышенную термическую нестабильность, Рис. П7.6 Приложения 18, что ранее было показано для NHPPI [279]. Среди однократно оксигенированных продуктов NTrpH только два вещества были доступны для идентификации и количественного определения, а именно N-ацетилоксиндолеаланин (NOIA) и N-ацетил-3α-гидроксипирролоиндол (NHPI), см. Рис. 7.4 (А) и структуры веществ на Схемах 1.5 и 1.10.

Димеры NTrpH представлены шестью формами, Рис. 7.4 (Б), ранее обнаруженными при KNAH[—]-сенсибилизированном анаэробном фотолизе NTrpH ([25], Глава 4 настоящей работы). Следует отметить, что ВЭЖХ-УФ-МС анализ выявил множество однократно и двукратно оксигенированных форм димеров diNTrpH. К сожалению, низкие концентрации этих продуктов не позволяют провести их количественную оценку.

Количественное определение diNTrpH и оксигенированных форм NTrpH проводили путем интегрирования соответствующих пиков хроматограмм, зарегистрированных по поглощению на 240, 280 или 315 нм. Концентрации продуктов монотонно увеличивались во время УФ-А фотолиза; динамики накопления продуктов в условиях барботрования растворов кислородом и воздухом приведены на Рис. П7.7. Замедление накопления некоторых продуктов на более поздних стадиях фотолиза указывает на участие этих продуктов во вторичных фотохимических процессах. Примечательно, что характер накопления оксигенированных форм diNTrpH, зарегистрированных с помощью ВЭЖХ-УФ-МС анализа, соответствует накоплению данных продуктов во вторичных фотохимических реакциях (данные не показаны).

Количество продуктов NTrpH, оцененное с помощью ВЭЖХ-УФ анализа, составляет 75-90 % от количества NTrpH, деградировавшего на начальных этапах фотолиза. Процентное соотношение продуктов NTrpH представлено на Рис. 7.5.



Рис. 7.5. Процентное соотношение продуктов NTrpH, образованных после 15 с УФ-А фотолиза (355 нм, 3 мДж) 0.3 мМ КNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH в условиях барботирования раствора кислородом или воздухом.

diNTrpH" Название столбца "сумма означает количество мономеров NTrpH, перешедших в состав diNTrpH, поэтому их количество рассчитывалось путем умножения количеств diNTrpH на коэффициент 2. Сравнение долей продуктов, образующихся в условиях барботирования растворов кислородом и воздухом, указывает на слабое влияние C(O₂) на состав продуктов. В то же время увеличение C₀(NTrp[•]) способствует небольшому изменению долей продуктов, см. Рис. П7.8 Приложения 18: увеличению выхода оксигенированных форм и одновременному снижению выхода diNTrpH. В среднем, доля оксигенированных форм NTrpH среди продуктов NTrpH сохраняется на уровне 60-65 %, а diNTrpH – на уровне 15-25 %. Следует отметить, что с увеличением дозы облучения количество идентифицированных продуктов NTrpH всё хуже и хуже соответствует количеству деградировавшего NTrpH. Например, к 60 секундам фотолиза идентифицированные продукты составляют ≈ 65-80 % разложившегося NTrpH, остальные 20-35 % остаются неидентифицированными. По-видимому, это явление объясняется вступлением первичных продуктов фотолиза во вторичные фотохимические реакции с образованием большого набора новых продуктов в малых концентрациях, включая одно- и двукратное оксигенирование димеров триптофана.

Анализ продуктов KNAH[—] был проведен лишь для условий 6 мДж/импульс и барботировании раствора кислородом, так как в остальных условиях незначительная

деградация KNAH[—] не приводит к образованию продуктов KNAH[—] в количествах, доступных для регистрации, Рис. 7.4. Среди всех известных продуктов KNAH[—] фотохимического происхождения ([25], Глава 6 настоящей работы) ВЭЖХ-УФ анализ показал присутствие 1,4DHQ и ddOKNA2. Наблюдаемое увеличение распада KNAH[—] при барботировании раствора воздухом, по-видимому, является следствием снижения скорости реакции 7.3, что приводит к увеличению вклада реакций KNAH₂^{•—}, наблюдавшихся в анаэробных средах (работа [25] и Глава 4 настоящей работы).

В данной работе было предположено, что основные фотохимические реакции протекают на масштабе сотен микросекунд после импульса лазера. Однако в рамках Схемы A2 было предположено образование пероксильных радикалов, реакции с участием которых могут протекать на более длительных масштабах времени. В случае образования иных долгоживущих частиц можно ожидать дальнейших реакций в растворе в отсутствии УФ-А излучения.

Для определения вклада темновых процессов после окончания анаэробного фотолиза были измерены спектры оптического поглощения для двух образцов, содержащих одинаковое количество KNAH⁻ (0.3 мМ) и различные концентрации NTrpH (2 и 10 мМ). В случае 10 мМ NTrpH раствор обладал высокой оптической плотностью (более 10) в диапазоне длин волн короче 310 нм, поэтому измерения были проведены при разбавлении пробы в водном буферном растворе в соотношении 1:60. В случае 2 мМ NTrpH измерения были проведены без последующего разбавления с использованием кюветы с коротким оптическим путем (2 мм). Динамика изменения в спектрах поглощения растворов после фотолиза для обоих случаев приведена на Рис. 7.6, (А), (Б). Можно видеть монотонное уменьшение поглощения на 280 нм и накопление продуктов, поглощающих в области длин волн более 300 нм с постепенным достижением стационарного состояния.

Основное отличие между двумя экспериментами заключается в концентрации реагентов и долгоживущих частиц. В случае, если долгоживущие интермедиаты реагируют между собой и другими молекулами, в первую очередь KNAH⁻ и NTrpH, посредством бимолекулярных реакций, то можно ожидать разной скорости изменений в спектрах поглощения. В обоих случаях эволюция сигнала на 280 нм отражает близкие характерные времена достижения конечного состояния системы, см. Рис. 7.6 (В). Этот факт указывает на независимость скорости остаточных процессов от C(KNAH⁻) или C(NTrpH) и предполагает мономолекулярный механизм темновых реакций. Интерполяция динамики деградации NTrpH к моменту окончания фотолиза показывает, что остаточные процессы протекают довольно быстро (Рис. 7.7 (В)), приводя к ≈ 8% деградации NTrpH через 5 минут окончания облучения. Таким образом, обнаруженные методом ВЭЖХ-УФ/МС, соответствуют преимущественно продукты, продуктам, образованным непосредственно в радикальных реакциях NTrp[•].



Рис. 7.6. Динамика изменения спектров поглощения растворов после окончания аэробного УФ-А фотолиза (355 нм, 3 мДж) 0.3 мМ КNАН[—] и (А) 10.0 мМ (Б) 2.0 мМ NTrpH относительно первоначального спектра поглощения, соответствующего 30 с после окончания фотолиза. (В) Динамика изменения поглощения растворов на 280 нм для случая 10.0 (черный цвет) и 2.0 мМ (синий цвет) NTrpH.

7.6. Оценка выходов продуктов фотолиза триптофана на основе кинетической схемы.

Сравнение результатов с экспериментальными значениями

Кинетические параметры предложенной Схемы А2, рассчитанные при аппроксимации экспериментальных кинетических кривых TA, позволяют оценить вклад реакций 7.2.К1, 7.2.К2, 7.4, 7.5, 7.6 и 7.4.А2 в гибель NTrp[•]. Расчетные выходы продуктов соответствующих радикальных реакций, F(реакция), для энергии лазерного импульса 3 мДж приведены в Таблице 7.2.

Таблица 7.2. Расчетные значения F(реакция) для энергии лазерного импульса 3 мДж.

Среда	$F(NTrp^{\bullet} + O_2^{\bullet-})$	$F(NTrp^{\bullet} + NTrp^{\bullet})$	$F(K2^{\bullet-} + NTrp^{\bullet})$	$F(K2OO^{\bullet-} + NTrp^{\bullet})$	F _{deg} (NTrpH)
_	%	%	%	%	%
Кислород	40	30	18	12	82
Воздух	34	24	37	5	63

Рассчитанные значения F(реакция) для энергии 6 мДж/импульс указаны в Таблице П7.8 Приложения 18. Значения F(реакция) показывают, что, несмотря на не 100%-ю эффективность генерации O_2^{\bullet} в реакциях KNAH₂^{•-} с O_2 , реакция между NTrp[•] и O_2^{\bullet} остается доминирующим путем гибели NTrp[•] в условиях барботирования раствора кислородом. В условиях барботирования воздухом эффективность реакции между NTrp[•] и O_2^{\bullet} снижается, уступая реакциям 7.2.K1 и 7.2.K2.

Экспериментальные значения выходов продуктов NTrpH в реакциях NTrp[•], F(продукт), были получены следующим образом:

 $F(продукт) = F_{deg}(NTrpH) \cdot [\%$ продукта от общего количества деградировавшего NTrpH].

Полученные величины для энергии лазерного импульса 3 мДж приведены в Таблице 7.3, для 6 мДж – в Таблице П7.9 Приложения 18. Выход основного состояния NTrpH,

123

восстанавливающегося в радикальных реакциях 7.2.К1 и 7.2.К2, F_{восст}(NTrpH), был определен как 100 - F_{deg}(NTrpH); см. значения F_{восст}(NTrpH) в Таблице 7.3 и П7.9 Приложения 18.

Таблица 7.3. Экспериментальные значения F(продукт) и F_{восст}(NTrpH) для энергии лазерного импульса 3 мДж.

Среда	F(NTrpH +O/O ₂) / %	F(diNTrpH) / %	F _{deg} (NTrpH) / %	F _{BOCCT} (NTrpH) / %
Кислород	62	15	77	23
Воздух	56	15	71	29

Расчетные значения F(реакция) показывают, что при барботировании раствора кислородом основным путём гибели NTrpH является реакция между NTrp[•] и $O_2^{•-}$. В то же время, экспериментальные данные показали, что в данных условиях наибольшую долю продуктов радикальных реакций NTrpH, включая восстановленный NTrpH, составляют оксигенированные формы NTrpH. Таким образом, можно сделать вывод, что образование оксигенированных форм, реакция 7.5, является доминирующим путём реакции NTrp[•] и $O_2^{•-}$. Источником diNTrpH является хорошо известная реакция димеризации NTrp[•].

Экспериментальные выходы деградации NTrpH практически не зависят от $C_0(NTrp^*)$, что подтверждает отсутствие моно- и псевдомономолекулярных реакций гибели NTrp*. Сравнение экспериментальных значений $F_{deg}(NTrpH)$ с расчетными данными показывает хорошее согласие в случае атмосферы кислорода, тогда как для воздуха экспериментальное значение $F_{deg}(NTrpH)$ на 8 и 12 % выше расчётного в случае энергии лазерного импульса 3 и 6 мДж, соответственно. Следует отметить, что Схема A2 содержит два фактора, которые объясняют снижение $F_{deg}(NTrpH)$ в атмосфере воздуха по сравнению с атмосферой кислорода. Во-первых, реакция между KNAH₂⁻⁻ и O₂ в атмосфере воздуха протекает медленнее, чем в атмосфере кислорода, что увеличивает эффективность восстановления NTrpH в реакции 7.2.К1 на 5 %. Во-вторых, при уменьшении С(O₂) в атмосфере воздуха равновесие 7.3.К2.f/7.3.К2.b смещается в сторону K2⁻⁻, что также приводит к ускорению восстановления NTrpH в реакции 7.2.К2. Вклад данного фактора в снижение $F_{deg}(NTrpH)$ в атмосфере воздуха равновесие воздуха выше, и составляет около 15%. Экспериментальное же снижение $F_{deg}(NTrpH)$ для атмосферы воздуха по сравнению с кислородом составляет 6-7%, что не подтверждает существование влияния равновесия 7.3.К2.f/7.3.K2.b.

Сравнивая экспериментальные и расчетные данные, также можно отметить, что экспериментальные значения $F(NTrpH+O/O_2)$ примерно на 20 % выше расчетных. Данное расхождение нельзя полностью объяснить незначительным вкладом реакций ¹O₂, оцененным ранее (см. Приложение 14). Возможно, дополнительным источником оксигенированного NTrpH может являться реакция K2OO^{•—} с NTrp[•], реакция 7.4.A2, с бимолекулярной константой скорости, оцененной как $3.3 \cdot 10^8$ M⁻¹c⁻¹. Рассматривая возможное протекание данной реакции,

важно отметить, что анализ деградации KNAH[—] показал практически полное восстановление KNAH[—] в результате радикальных реакций. Таким образом, итог реакции между K2OO^{•—} и NTrp[•] с точки зрения образования продуктов KNAH[—] схож с итогом последовательных реакций 7.3.К1 и 7.5. На основании этих замечаний можно предположить, что образование частицы K2OO^{•—} может сопровождаться дальнейшей мономолекулярной реакцией распада с отщеплением HOO[•]/O₂^{•—}:

 $K2^{\bullet-} + O_2 \rightleftharpoons K2OO^{\bullet-} \rightarrow KNAH^- + O_2^{\bullet-}$

В этом случае реакцию 7.4.А2 можно интерпретировать как гибель NTrp[•] в реакции с O_2^{--} , медленно образующимся в реакции распада K2OO^{•--}. Стоит отметить, что ранее схожий механизм восстановления фенолов был предложен в работе [280], описывающей двухстадийную реакцию феноксильного радикала с O_2 с обратимым образованием пероксильного радикала и дальнейшим отщеплением от него HOO[•].

Заключение по материалам главы 7

Анализ гибели радикала Trp' при аэробных условиях показал, что генерация O_2^{--} при KNAH⁻⁻-сенсибилизированном фотолизе TrpH менее эффективна, чем это предполагалось ранее. Это указывает на существование иных реакций между KNAH₂⁻⁻ и O₂, помимо реакции переноса электрона на молекулярный кислород. Возможным объяснением недостатка O₂⁻⁻ может являться различная химическая активность двух таутомерных форм KNAH₂⁻⁻ по отношению к O₂. Анализ кинетических кривых TA набором реакций Схемы A2 показал, что данная модель хорошо описывает экспериментальные данные, полученные при широком наборе условий, и характеризуется значениями как коэффициентов экстинкции, так и констант скорости, близким к типичным значениям данных величин. Данная модель показывает, что только около 50 % частиц KNAH₂⁻⁻ подвергаются окислению молекулярным кислородом с образованием O₂⁻⁻; другие 50 % реагируют с O₂ с образованием менее реакционно-активных частиц, предположительно, пероксильных радикалов.

Анализ кинетики и продуктов реакций Trp' при KNAH[—]-сенсибилизированном аэробном фотолизе TrpH, показал, что недостаток O_2^{+-} , связанный со сложными реакциями KNAH₂⁺⁻, не приводит к существенному снижению вклада реакции между Trp' и O_2^{+-} в гибель Trp'. В рамках Схемы A2 это наблюдение может быть объяснено низким значением константы скорости реакции между предполагаемыми пероксильными радикалами и Trp', $3.3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, которая значительно ниже константы скорости реакции между Trp' и O_2^{+-} , $1.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [75]. Использование комбинации оптической регистрации Trp' и TrpH и ВЭЖХ-УФ анализа стабильных продуктов фотолиза подтвердило доминирование канала образования продуктов оксигенирования TrpH в реакции между Trp' и O_2^{+-} .

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В рамках данной диссертационной работы были проведены исследования механизмов повреждения аминокислоты триптофан, в результате радикальных реакций, фотоиндуцированных кинуреновой кислотой. На основании полученных результатов был сделан ряд выводов.

1. Реакция между ³KNAH⁻ и TrpH протекает по механизму последовательного переноса электрона и протона от TrpH к ³KNAH⁻ с образованием радикалов KNAH₂⁻⁻ и Trp⁻.

2. (А) Уменьшение pH водной среды от 7 до 3 приводит к снижению степени фотоиндуцированного повреждения свободного TrpH без изменений в составе образующихся продуктов. Это обусловлено увеличением константы скорости обратного переноса электрона от KNAH₂^{•—} к радикалу триптофана с восстановлением исходных реагентов. В свою очередь, ускорение обратного переноса электрона связано с образованием протонированного радикала, TrpH^{•+}, который является более сильным окислителем по сравнению с нейтральным радикалом Trp[•].

(Б) Степень повреждения белка HEWL не меняется в широком диапазоне pH 3–7 и не зависит от кислотно-основного равновесия Trp'/TrpH⁺⁺ в составе HEWL. Однако снижение pH от 7 до 5 существенно меняет характер основного повреждения остатков TrpH с кросс-сшивания на ковалентное присоединение кислорода (оксигенирование), что обусловлено сильной pH-зависимостью констант скорости и высокой конкуренцией реакций димеризации и оксигенирования за радикальные центры Trp' в составе HEWL.

3. Реакция фотоиндуцированного диспропорционирования KNAH[—] протекает по механизму переноса атома H от основного состояния KNAH[—] к ³KNAH[—] с образованием ранее неизвестного радикала KNA^{•—}, способного вступать в реакцию ковалентного присоединения с другими радикалами KNA^{•—} с образованием димерных продуктов.

4. Реакция между Trp[•] и $O_2^{\bullet-}$ протекает с выходом оксигенированных форм TrpH, близким к 100%, что делает данную реакцию опасным источником повреждения TrpH. Также было обнаружено, что KNAH⁻⁻ является менее эффективным фотохимическим генератором $O_2^{\bullet-}$, нежели это предполагалось ранее.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕАТУРЫ

- 1. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry / D. Harman // Journal of Gerontology. 1956. Vol. 11, № 3. P. 298–300.
- 2. Stadtman E.R. Protein Oxidation and Aging / E.R. Stadtman // Science. 1992. Vol. 257, № 5074. P. 1220–1224.
- Kirkwood T.B.L. The free-radical theory of ageing older, wiser and still alive: Modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support / T.B.L. Kirkwood, A. Kowald // BioEssays. 2012. Vol. 34, № 8. P. 692–700.
- 4. Gladyshev V.N. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! / V.N. Gladyshev // Antioxid Redox Signal. 2014. Vol. 20, № 4. P. 727–731.
- Chotimol P. Correlation between cardio-ankle vascular index and biomarkers of oxidative stress / P. Chotimol, C. Saehuan, S. Kumphune // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2016. – Vol. 76, № 2. – P. 105–111.
- Chandrasekaran A. Redox control of senescence and age-related disease / A. Chandrasekaran, M.D.P.S. Idelchik, J.A. Melendez // Redox Biology. – 2017. – Vol. 11. – P. 91–102.
- 7. Daenen K. Oxidative stress in chronic kidney disease / K. Daenen, A. Andries, D. Mekahli, A. Van Schepdael, F. Jouret, B. Bammens // Pediatr Nephrol. 2019. Vol. 34, № 6. P. 975–991.
- Migliore L. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging / L. Migliore, F. Coppedè // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2009. Vol. 674, № 12. – P. 73–84.
- 9. Kim G.H. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases / G.H. Kim, J.E. Kim, S. Jeong Rhie, S. Yoon // Exp Neurobiol. 2015. Vol. 24, № 4. P. 325–340.
- Varma S.D. Role of Ultraviolet Irradiation and Oxidative Stress in Cataract Formation— Medical Prevention by Nutritional Antioxidants and Metabolic Agonists / S.D. Varma, S. Kovtun, K.R. Hegde // Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice. – 2011. – Vol. 37, № 4. – P. 233– 245.
- 11. Du X.-L. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation / X.-L. Du, D. Edelstein, L. Rossetti, I.G. Fantus, H. Goldberg, F. Ziyadeh, J. Wu, M. Brownlee // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000. Vol. 97, № 22. P. 12222–12226.
- 12. **Halliwell B.** Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. Oxford University Press, 2015.
- Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation / M.J. Davies // Biochemical Journal. 2016.
 Vol. 473, № 7. P. 805–825.
- Hawkins C.L. Generation and propagation of radical reactions on proteins / C.L. Hawkins, M.J. Davies // Biochim Biophys Acta. – 2001. Vol. 1504, № 2–3. – P. 196–219.
- 15. **Salisbury D.** Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Impact on Endothelial Dysfunction / D. Salisbury, U. Bronas // Nursing Research. 2015. Vol. 64, № 1. P. 53–66.
- 16. **Truscott R.J.W.** Age-related nuclear cataract—oxidation is the key / R.J.W. Truscott // Experimental Eye Research. 2005. Vol. 80, № 5. P. 709–725.
- Schey K.L. Spatiotemporal changes in the human lens proteome: Critical insights into longlived proteins / K.L. Schey, Z. Wang, M.G. Friedrich, D.L. Garland, R.J.W. Truscott // Progress in Retinal and Eye Research. – 2020. – Vol. 76. – P. 100802.

DeFelippis M.R. Pulse radiolytic measurement of redox potentials: the tyrosine and tryptophan radicals / M.R. DeFelippis, C.P. Murthy, M. Faraggi, M.H. Klapper // Biochemistry. – 1989. – Vol. 28, № 11. – P. 4847–4853.

19. **Wistow G.** Molecular biology and evolution of crystallins: gene recruiment and multifunctional proteins in the eye lens / G. Wistow. – New York Berlin Heidelberg: Springer, 1995 - 170 p.

- Souza J.M. Dityrosine Cross-linking Promotes Formation of Stable α-Synuclein Polymers / J.M. Souza, B.I. Giasson, Q. Chen, V.M. Lee, H. Ischiropoulos // Journal of Biological Chemistry. - 2000. Vol. - 275, № 24. P. - 18344–18349.
- 21. Al-Hilaly Y.K. A central role for dityrosine crosslinking of Amyloid-β in Alzheimer's disease / Y.K. Al-Hilaly, T.L. Williams, M. Stewart-Parker, L. Ford, E. Skaria, M. Cole, W.G. Bucher, K.L. Morris, A.A. Sada, J.R. Thorpe, L.C. Serpell // acta neuropathol commun. 2013. Vol. 1, № 1. P. 83.
- Leeuwenburgh C. Mass Spectrometric Quantification of Markers for Protein Oxidation by Tyrosyl Radical, Copper, and Hydroxyl Radical in Low Density Lipoprotein Isolated from Human Atherosclerotic Plaques / C. Leeuwenburgh, J.E. Rasmussen, F.F. Hsu, D.M. Mueller, S. Pennathur, J.W. Heinecke // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272, № 6. – P. 3520–3526.
- Paviani V. Human cataractous lenses contain cross-links produced by crystallin-derived tryptophanyl and tyrosyl radicals / V. Paviani, P.J. de Melo, A. Avakin, P. Di Mascio, G.E. Ronsein, O. Augusto // Free Radical Biology and Medicine. 2020. Vol. 160. P. 356-367.
- 24. Sherin P.S. Aggregation of α-crystallins in kynurenic acid-sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions / P.S. Sherin, E.A. Zelentsova, E.D. Sormacheva, V.V. Yanshole, T.G. Duzhak, Yu.P. Tsentalovich // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. Vol. 18, № 13. P. 8827–8839.
- Sormacheva E.D. Dimerization and oxidation of tryptophan in UV-A photolysis sensitized by kynurenic acid / E.D. Sormacheva, P.S. Sherin, Y.P. Tsentalovich // Free Radic Biol Med. – 2017. – Vol. 113. – P. 372–384.
- Silva E. Riboflavin-induced Type 1 photo-oxidation of tryptophan using a high intensity 365 nm light emitting diode / E. Silva, P. Barrias, E. Fuentes-Lemus, C. Tirapegui, A. Aspee, L. Carroll, M.J. Davies, C. López-Alarcón // Free Radical Biology and Medicine. 2019. Vol. 131. P. 133–143.
- Fuentes-Lemus E. Binding of rose bengal to lysozyme modulates photooxidation and crosslinking reactions involving tyrosine and tryptophan / E. Fuentes-Lemus, M. Mariotti, P. Hägglund, F. Leinisch, A. Fierro, E. Silva, C. López-Alarcón, M.J. Davies // Free Radical Biology and Medicine. – 2019. – Vol. 143. – P. 375–386.
- 28. **Savina E.D.** UV-A induced damage to lysozyme via Type I photochemical reactions sensitized by kynurenic acid / E.D. Savina, Y.P. Tsentalovich, P.S. Sherin // Free Radical Biology and Medicine. 2020. Vol. 152. P. 482–493.
- 29. **Rustom R.** Oxidative Stress in a Novel Model of Chronic Acidosis in LLC-PK1 Cells / R. Rustom, B. Wang, F. McArdle, L. Shalamanova, J. Alexander, A. McArdle, C.E. Thomas, M.L. Bone, A. Shenkin, M.L. Jackson // Nephron Exp Nephrol. 2004. Vol. 95, № 1. P. e13–e23.
- Mikaelian N.P. Dysfunction of Membrane-Receptor System of Blood Cells and Kidney Tissue in Experimental Diabetes Mellitus / N.P. Mikaelian, A.E. Gurina, A.A. Terent'ev // Bull Exp Biol Med. – 2013. – Vol. 154, № 5. – P. 610–613.
- 31. Siemkowicz E. Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats / E. Siemkowicz, A.J. Hansen // Stroke. 1981. Vol. 12, № 2. P. 236–240.
- 32. **Gineyts E.** Racemization and isomerization of type I collagen C-telopeptides in human bone and soft tissues: assessment of tissue turnover / E. Gineyts, P.A. Cloos, O. Borel, L. Grimaud, P.D. Delmas, P. Garnero // Biochem J. 2000. Vol. 345 Pt 3, № Pt 3. P. 481–485.
- 33. Lynnerup N. Radiocarbon Dating of the Human Eye Lens Crystallines Reveal Proteins without Carbon Turnover throughout Life / N. Lynnerup, H. Kjeldsen, S. Heegaard, C. Jacobsen, J. Heinemeier // PLoS ONE / ed. Gazit E. 2008. Vol. 3, № 1. P. e1529.

- Truscott R.J.W. Old Proteins in Man: A Field in its Infancy / R.J.W. Truscott, K.L. Schey, M.G. Friedrich // Trends in Biochemical Sciences. - 2016. - Vol. 41, № 8. - P. 654–664.
- 35. **Davies M.J.** The oxidative environment and protein damage / M.J. Davies // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics. 2005. Vol. 1703, № 2. P. 93–109.
- 36. Sies H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies,
 D.P. Jones // Nat Rev Mol Cell Biol. 2020. Vol. 21, № 7. P. 363-383.
- 37. **Turrens J.F.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F. Turrens // The Journal of Physiology. 2003. Vol. 552, № 2. P. 335–344.
- 38. Bielski B.H.J. Ross A.B. Reactivity of HO2/O-2 Radicals in Aqueous Solution / B.H.J. Bielski, D.E. Cabelli, R.L. Arudi, // Journal of Physical and Chemical Reference Data. 1985. Vol. 14, № 4. P. 1041–1100.
- 39. **Bielski B.H.J.** Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals / B.H.J. Bielski, A.O. Allen // J. Phys. Chem. 1977. Vol. 81, № 11. P. 1048–1050.
- 40. **Fisher C.L.** The role of arginine 143 in the electrostatics and mechanism of Cu,Zn superoxide dismutase: computational and experimental evaluation by mutational analysis / C.L. Fisher, D.E. Cabelli, J.A. Tainer, R.A. Hallewell, E.D. Getzoff // Proteins. 1994. Vol. 19, № 1. P. 24–34.
- 41. **Radi R.** Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration / R. Radi // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004. Vol. 101, № 12. P. 4003–4008.
- 42. **Denicola A.** Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations / A. Denicola, B.A. Freeman, M. Trujillo, R. Radi // Arch Biochem Biophys. 1996. Vol. 333, № 1. P. 49–58.
- 43. **Bonini M.G.** Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide / M.G. Bonini, R. Radi, G. Ferrer-Sueta, A.M.D. Ferreira, O. Augusto // J Biol Chem. 1999. Vol. 274, № 16. P. 10802–10806.
- 44. **Masuda T.** Reactions of Hydroxyl Radicals with Nucleic Acid Bases and the Related Compounds in Gamma-irradiated Aqueous Solution / T. Masuda, H. Shinohara, M. Kondo // JRR. 1975. Vol. 16, № 3. P. 153–161.
- 45. Augusto O. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology / O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.C.X. Santos, S.D.L. Menezes // Free Radical Biology and Medicine. 2002. Vol. 32, № 9. P. 841–859.
- 46. **Prütz W.A.** Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins / W.A. Prütz, H. Mönig, J. Butler, E.J. Land // Arch Biochem Biophys. 1985. Vol. 243, № 1. P. 125–134.
- 47. Solar S. Reactivity of hydroxyl with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis / S. Solar, W. Solar, N. Getoff // J. Phys. Chem. 1984. Vol. 88, № 10. P. 2091–2095.
- 48. **Goldstein S.** Tyrosine nitration by simultaneous generation of (.)NO and O-(2) under physiological conditions. How the radicals do the job / S. Goldstein, G. Czapski, J. Lind, G. Merényi // J Biol Chem. 2000. Vol. 275, № 5. P. 3031–3036.
- 49. Armstrong R.C. Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan / R.C. Armstrong, A.J. Swallow // Radiat Res. 1969. Vol. 40, № 3. P. 563–579.
- Mujika J.I. Computational Study on the Attack of [•] OH Radicals on Aromatic Amino Acids / J.I. Mujika, J. Uranga, J.M. Matxain // Chemistry A European J. – 2013. – Vol. 19, № 21. – P. 6862–6873.
- 51. Li S. Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization / S. Li, C. Schöneich, R.T. Borchardt // Biotech & Bioengineering. 1995. Vol. 48, № 5. P. 490–500.
- Bellmaine S. Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins / S. Bellmaine, A. Schnellbaecher, A. Zimmer // Free Radic Biol Med. 2020. Vol. 160. P. 696–718.

- 53. **Harriman A.** Further comments on the redox potentials of tryptophan and tyrosine / A. Harriman // J. Phys. Chem. 1987. Vol. 91, № 24. P. 6102–6104.
- 54. Wardman P. Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution / P. Wardman // Journal of Physical and Chemical Reference Data. – 1989. – Vol. 18, № 4. – P. 1637–1755.
- 55. **Buettner G.R.** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alphatocopherol, and ascorbate / G.R. Buettner // Arch Biochem Biophys. – 1993. – Vol. 300, № 2. – P. 535–543.
- 56. **Wardman P.** [3] Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells / P. Wardman, C. Von Sonntag // Methods in Enzymology. Elsevier. 1995. Vol. 251. P. 31–45.
- 57. **Dryhurst G.** Applications of electrochemistry in studies of the oxidation chemistry of central nervous system indoles / G. Dryhurst // Chem. Rev. 1990. Vol. 90, № 5. P. 795–811.
- Narayanan D.L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer / D.L. Narayanan, R.N. Saladi,
 J.L. Fox // Int J Dermatology. 2010. Vol. 49, № 9. P. 978–986.
- 59. Sharma K.K. Lens aging: Effects of crystallins / K.K. Sharma, P. Santhoshkumar // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects. 2009. Vol. 1790, № 10. P. 1095–1108.
- 60. Wondrak G.T. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection / G.T. Wondrak, M.K. Jacobson, E.L. Jacobson // Photochem Photobiol Sci. 2006. Vol. 5, № 2. P. 215–237.
- 61. **Pattison D.I.** Photo-oxidation of proteins / D.I. Pattison, A.S. Rahmanto, M.J. Davies // Photochem Photobiol Sci. 2012. Vol. 11, № 1. P. 38–53.
- 62. Zigman S. Damage to cultured lens epithelial cells of squirrels and rabbits by UV-A (99.9%) plus UV-B (0.1%) radiation and alpha tocopherol protection / S. Zigman, T. McDaniel, J.B. Schultz, J. Reddan, M. Meydani // Mol Cell Biochem. 1995. Vol. 143, № 1. P. 35–46.
- 63. **Gaillard E.R.** Age-related changes in the absorption characteristics of the primate lens / E.R. Gaillard, L. Zheng, J.C. Merriam, J. Dillon // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000. Vol. 41, № 6. P. 1454–1459.
- 64. **Davies M.J.** Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences / M.J. Davies // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003. Vol. 305, № 3. P. 761–770.
- 65. **Bent D.V.** Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan / D.V. Bent, E. Hayon // J. Am. Chem. Soc. 1975. Vol. 97, № 10. P. 2612–2619.
- 66. **Petroselli G.** Oxidation of 2'-Deoxyguanosine 5'-Monophosphate Photoinduced by Pterin: Type I versus Type II Mechanism / G. Petroselli, M.L. Dántola, F.M. Cabrerizo, A.L. Capparelli, C. Lorente, E. Oliveros, A. Thomas // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130, № 10. P. 3001–3011.
- 67. **Bloemendal H.** Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins / H. Bloemendal, W. de Jong, R. Jaenicke, N.H. Lubsen, C. Slingsby, A. Tardieu // Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2004. Vol. 86, № 3. P. 407–485.
- 68. **Snytnikova O.A.** Kinetics and mechanism of reactions of photoexcited kynurenine with molecules of some natural compounds / O.A. Snytnikova, P.S. Sherin, L.V. Kopylova, Yu.P. Tsentalovich // Russ Chem Bull. 2007. Vol. 56, № 4. P. 732–738.
- Tsentalovich Yu.P. Mechanisms of reactions of flavin mononucleotide triplet with aromatic amino acids / Yu.P. Tsentalovich, J.J. Lopez, P.J. Hore, R.Z. Sagdeev // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2002. Vol. 58, № 9. P. 2043–2050.
- Paviani V. Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme / V. Paviani, R.F. Queiroz, E.F. Marques, P. Di Mascio, O. Augusto // Free Radical Biology and Medicine. 2015. Vol. 89. P. 72–82.

- Zhang H. Bicarbonate-dependent Peroxidase Activity of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase Induces Covalent Aggregation of Protein / H. Zhang, C. Andrekopoulo, J. Joseph, K. Chandran, H. Karoui, J.P. Crow, B. Kalyanaraman // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278, № 26. – P. 24078–24089.
- Rossi C. Reaction of cysteine residues with oxidized tyrosine residues mediates cross-linking of photo-oxidized casein proteins / C. Rossi, E. Fuentes-Lemus, M.J. Davies // Food Chemistry. – 2022. – Vol. 385. – P. 132667.
- 73. Medinas D.B. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity / D.B. Medinas, F.C. Gozzo, L.F.A. Santos, A.H. Iglesias, O. Augusto // Free Radical Biology and Medicine. 2010. Vol. 49, № 6. P. 1046–1053.
- 74. **Ferrer-Sueta G.** Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration / G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo, S. Bartesaghi, S. Carballal, N. Romero, B. Alvarez, R. Radi // Chem. Rev. 2018. Vol. 118, № 3. P. 1338–1408.
- 75. Fang X. Reaction of the superoxide radical with the N-centered radical derived from N-acetyltryptophan methyl ester / X. Fang, F. Jin, H. Jin, C. von Sonntag // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1998. –№ 2. P. 259–264.
- 76. Jin F. The superoxide radical reacts with tyrosine-derived phenoxyl radicals by addition rather than by electron transfer / F. Jin, J. Leitich, C. Von Sonntag // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 1993. – № 9. – P. 1583.
- Hägglund P. Identification and characterization of protein cross-links induced by oxidative reactions / P. Hägglund, M. Mariotti, M.J. Davies // Expert Review of Proteomics. 2018. Vol. 15, № 8. P. 665–681.
- 78. Fuentes-Lemus E. Photo-oxidation of lysozyme triggered by riboflavin is O2-dependent, occurs via mixed type 1 and type 2 pathways, and results in inactivation, site-specific damage and intra- and inter-molecular crosslinks / E. Fuentes-Lemus, M. Mariotti, J. Reyes, F. Leinisch, P. Hägglund, E. Silva, M.J. Davies, C. López-Alarcón // Free Radical Biology and Medicine. 2020. Vol. 152. P. 61–73.
- 79. Fuentes-Lemus E. Oxidative Crosslinking of Peptides and Proteins: Mechanisms of Formation, Detection, Characterization and Quantification / E. Fuentes-Lemus, P. Hägglund, C. López-Alarcón, M.J. Davies // Molecules. – 2021. – Vol. 27, № 1. – P. 15.
- 80. **Cook K.M.** Post-Translational Control of Protein Function by Disulfide Bond Cleavage / K.M. Cook, P.J. Hogg // Antioxidants & Redox Signaling. 2013. Vol. 18, № 15. P. 1987–2015.
- Heinecke J.W. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative crosslinking of proteins / J.W. Heinecke, W. Li, G.A. Francis, J.A. Goldstein // J. Clin. Invest. – 1993. – Vol. 91, № 6. – P. 2866–2872.
- 82. **Jacob J.S.** Human phagocytes employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system to synthesize dityrosine, trityrosine, pulcherosine, and isodityrosine by a tyrosyl radical-dependent pathway / J.S. Jacob, D.P. Cistola, F.F. Hsu, S. Muzaffar, D.M. Mueller, S.L. Hazen, J.W. Heinecke // J Biol Chem. 1996. Vol. 271, № 33. P. 19950–19956.
- Ursem R. Identification of Native Cross-Links in *Bacillus subtilis* Spore Coat Proteins / R. Ursem, B. Swarge, W.R. Abhyankar, H. Buncherd, L.J. de Koning, P. Setlow, S. Brul, G. Kramer // J. Proteome Res. 2021. Vol. 20, № 3. P. 1809–1816.
- 84. Mai K. Peroxidase catalysed cross-linking of an intrinsically unstructured protein via dityrosine bonds in the oocyst wall of the apicomplexan parasite, Eimeria maxima / K. Mai, N.C. Smith, Z-P. Feng, M. Katrib, J. Slapeta, I. Slapetova, M.G. Wallach, C. Luxford, M.J. Davies, X. Zhang, R.S. Norton, S. Belli // International Journal for Parasitology. 2011. Vol. 41, № 11. P. 1157–1164.

- 85. Deits T. Purification and properties of ovoperoxidase, the enzyme responsible for hardening the fertilization membrane of the sea urchin egg / T. Deits, M. Farrance, E.S. Kay, L. Medill, E.E. Turner, P.J. Weidman, B.M. Shapiro // J Biol Chem. – 1984. – Vol. 259, № 21. – P. 13525–13533.
- Briza P. N,N'-Bisformyl dityrosine is an in vivo precursor of the yeast ascospore wall / P. Briza, H. Kalchhauser, E. Pittenauer, G. Allmaier, M. Breitenbach // Eur J Biochem. 1996. Vol. 239, № 1. P. 124–131.
- Fry S.C. Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein / S.C. Fry // Biochem J. – 1982. – Vol. 204, № 2. – P. 449–455.
- Mishler-Elmore J.W. Held Extensins: Self-Assembly, Crosslinking, and the Role of Peroxidases / J.W. Mishler-Elmore, Y. Zhou, A. Sukul, M. Oblak, L. Tan, A. Faik, M.A. // Front. Plant Sci. – 2021. – Vol. 12. – P. 664738.
- 89. Andersen S.O. THE CROSS-LINKS IN RESILIN IDENTIFIED AS DITYROSINE AND TRITYROSINE / S.O. Andersen // Biochim Biophys Acta. 1964. Vol. 93. P. 213–215.
- 90. Lopez-Llorca L.V. Dityrosine, Trityrosine and Tetratyrosine, Potential Cross-Links in Structural Proteins of Plant-Parasitic Nematodes / L.V. Lopez-Llorca, S.C. Fry // Nematol. – 1989. – Vol. 35, № 2. – P. 165–179.
- 91. Adam O. Increased lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during atrial fibrillation / O. Adam, K. Theobald, D. Lavall, M. Grube, H.K. Kroemer, S. Ameling, H.-J. Schäfers, M. Böhm, U. Laufs // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2011. Vol. 50, № 4. P. 678–685.
- 92. Andringa G. Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease / G. Andringa, K.Y. Lam, M. Chegary, X. Wang, T.N. Chase, M.C. Bennett // FASEB j. – 2004. – Vol. 18, № 7. – P. 932–934.
- 93. **Tiwari A.K.** Machine Learning Based Approaches for Prediction of Parkinson's Disease / A.K. Tiwari // MLAIJ. 2016. Vol. 3, № 2. P. 33–39.
- 94. Pennathur S. Mass Spectrometric Quantification of 3-Nitrotyrosine, ortho-Tyrosine, and o,o'-Dityrosine in Brain Tissue of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated Mice, a Model of Oxidative Stress in Parkinson's Disease / S. Pennathur, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski, J.W. Heinecke // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274, № 49. – P. 34621–34628.
- 95. Kato Y. Quantification of Modified Tyrosines in Healthy and Diabetic Human Urine using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry / Y. Kato, N. Dozaki, T. Nakamura, N. Kitamoto, A. Yoshida, M. Naito, M. Kitamura, T. Osawa // J. Clin. Biochem. Nutr. – 2009. – Vol. 44, № 1. – P. 67–78.
- 96. Wu G.-R. Elevated Plasma Dityrosine in Patients with Hyperlipidemia Compared to Healthy
- Individuals / G.-R. Wu, M. Cheserek, Y.-H. Shi, L.-Y. Shen, J. Yu, G-W. Le // Ann Nutr Metab. -

2015. – Vol. 66, № 1. – P. 44–50.

- 97. Sies H. Oxidative Stress / H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones // Annu. Rev. Biochem. 2017. Vol. 86, № 1. – P. 715–748.
- 98. Kehm R. Protein oxidation Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases / R. Kehm, T. Baldensperger, J. Raupbach, A. Höhn // Redox Biology. – 2021. – Vol. 42. – P. 101901.
- 99. DiMarco T. Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples / T. DiMarco, C. Giulivi // Mass Spectrometry Reviews. 2007. Vol. 26, № 1. P. 108–120.
- 100. Blaskovic S. Di-Tyrosine Crosslinking and NOX4 Expression as Oxidative Pathological Markers in the Lungs of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis / S. Blaskovic, Y. Donati, I. Ruchonnet-Metrailler, T. Seredenina, K.-H. Krause, J.-C. Pache, D. Adler, C. Barazzone-Argiroffo, V. Jaquet // Antioxidants (Basel). – 2021. – Vol. 10, № 11. – P. 1833.

- 101. **Makwana K.M.** Trp-Trp Cross-Linking: A Structure–Reactivity Relationship in the Formation and Design of Hyperstable Peptide β-Hairpin and α-Helix Scaffolds / K.M. Makwana, R. Mahalakshmi // Org. Lett. 2015. Vol. 17, № 10. P. 2498–2501.
- 102. **Min K.** Direct Synthesis of a Covalently Self-Assembled Peptide Nanogel from a Tyrosine-Rich Peptide Monomer and Its Biomineralized Hybrids / K. Min, D.-H. Kim, H.-J. Lee, L. Lin, D.-P. Kim // Angew Chem Int Ed. 2018. Vol. 57, № 20. P. 5630–5634.
- 103. Tian Y. A covalent crosslinking strategy to construct a robust peptide-based artificial esterase / Y. Tian, L. Yang, X. Peng, W. Qi, M. Wang // Soft Matter. – 2023. – Vol. 19, № 19. – P. 3458– 3463.
- 104. Liu J. Enzymatic dimerization in the biosynthetic pathway of microbial natural products / J. Liu, A. Liu, Y. Hu // Nat. Prod. Rep. 2021. Vol. 38, № 8. P. 1469–1505.
- 105. Gilis D. Optimality of the genetic code with respect to protein stability and amino-acid frequencies / D. Gilis, S. Massar, N.J. Cerf, M. Rooman // Genome Biol. 2001. Vol. 2, № 11. P. RESEARCH0049.
- 106. Carroll L. Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins / L. Carroll, D.I. Pattison, J.B. Davies, R.F. Anderson, C. Lopez-Alarcon, M.J. Davies // Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – Vol. 113. – P. 132–142.
- 107. Figueroa J.D. Formation and characterization of crosslinks, including Tyr–Trp species, on one electron oxidation of free Tyr and Trp residues by carbonate radical anion / J.D. Figueroa, A.M. Zárate, E. Fuentes-Lemus, M.J. Davies, C. Lopez-Alarcon // RSC Adv. 2020. Vol. 10, № 43. P. 25786–25800.
- 108. Mariotti M. Cross-linking and modification of fibronectin by peroxynitrous acid: Mapping and quantification of damage provides a new model for domain interactions / M. Mariotti, A. Rogowska-Wrzesinska, P. Hägglund, M.J. Davies // Journal of Biological Chemistry. 2021. Vol. 296. P. 100360.
- 109. Leinisch F. Peroxyl radical- and photo-oxidation of glucose 6-phosphate dehydrogenase generates cross-links and functional changes via oxidation of tyrosine and tryptophan residues / F. Leinisch, M. Mariotti, M. Rykaer, C. Lopez-Alarcon, P. Hägglund, M.J. Davies // Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – Vol. 112. – P. 240–252.
- 110. Leo G. Ultraviolet laser-induced cross-linking in peptides / G. Leo, C. Altucci, S. Bourgoin-Voillard, A.M. Gravagnuolo, R. Esposito, G. Marino, C. Costello, R. Velotta, L. Birolo // Rapid Comm Mass Spectrometry. – 2013. – Vol. 27, № 14. – P. 1660–1668.
- 111. Mariotti M. Mass-Spectrometry-Based Identification of Cross-Links in Proteins Exposed to Photo-Oxidation and Peroxyl Radicals Using ¹⁸O Labeling and Optimized Tandem Mass Spectrometry Fragmentation / M. Mariotti, F. Leinisch, D.J. Leeming, B. Svensson, M.J. Davies, P. Hägglund // J. Proteome Res. – 2018. – Vol. 17, № 6. – P. 2017–2027.
- 112. Coelho F.R. Oxidation of the Tryptophan 32 Residue of Human Superoxide Dismutase 1 Caused by Its Bicarbonate-dependent Peroxidase Activity Triggers the Non-amyloid Aggregation of the Enzyme / F.R. Coelho, A. Iqbal, E. Linares, D.F. Silva, F.S. Lima, I.M. Cuccovia, O. Augusto // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289, № 44. – P. 30690–30701.
- 113. Zhang H. Mass spectral evidence for carbonate-anion-radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu, Zn superoxide dismutase / H. Zhang, J. Joseph, J. Crow, B. Kalyanaraman // Free Radical Biology and Medicine. 2004. Vol. 37, № 12. P. 2018–2026.
- 114. Li Y. Characterization of the Degradation Products of a Color-Changed Monoclonal Antibody: Tryptophan-Derived Chromophores / Y. Li, A. Polozova, F. Gruia, J. Feng // Anal. Chem. – 2014. – Vol. 86, № 14. – P. 6850–6857.

- 115. Davies M.J. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease / M.J. Davies, S. Fu, H. Wang, R.T. Dean // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 27, № 11–12. – P. 1151–1163.
- 116. Taylor S.W. Oxidative Post-translational Modification of Tryptophan Residues in Cardiac Mitochondrial Proteins / S.W. Taylor, E. Fahy, J. Murray, R.A. Capaldi, S.S Ghosh. // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278, № 22. – P. 19587–19590.
- 117. Unni S. Tryptophan Oxidation in the UQCRC1 Subunit of Mitochondrial Complex III (Ubiquinol-Cytochrome C Reductase) in a Mouse Model of Myodegeneration Causes Large Structural Changes in the Complex: A Molecular Dynamics Simulation Study / S. Unni, S. Thiyagarajan, S.M.M. Bharath, B. Padmanabhan // Sci Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 10694.
- 118. Bharath S.M.M. Post-Translational Oxidative Modifications of Mitochondrial Complex I (NADH: Ubiquinone Oxidoreductase): Implications for Pathogenesis and Therapeutics in Human Diseases / S.M.M. Bharath // J Alzheimers Dis. – 2017. Vol. 60, № s1. – P. S69–S86.
- Hunzinger C. Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including N-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species / C. Hunzinger, W. Wozny, G.P. Schwall, S. Poznanović, W. Stegmann, H. Zengerling, R. Schoepf, K. Groebe, M.A. Cahill, H.D. Osiewacz, N. Jägemann, M. Bloch, N.A. Dencher, F. Krause, A. Schrattenholz // J Proteome Res. 2006. Vol. 5, № 3. P. 625–633.
- 120. Møller I.M. Protein oxidation in plant mitochondria detected as oxidized tryptophan / I.M. Møller, B.K. Kristensen // Free Radical Biology and Medicine. 2006. Vol. 40, № 3. P. 430–435.
- 121. Ahmed N. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment / N. Ahmed, U. Ahmed, P.J. Thornalley, K. Hager, G. Fleischer, G. Münch // J Neurochem. 2005. Vol. 92, № 2. P. 255–263.
- 122. Chen J. Open Search-Based Proteomics Reveals Widespread Tryptophan Modifications Associated with Hypoxia in Lung Cancer / J. Chen, L. Zhang, Z. Sun, H. Li, J. Li, X. Xue, Q. Zhu, B. Dong, Y. Wang, Y. Yang, Y. Dong, G. Guo, H. Jiang, A. Zhang, G. Zhang, Z. Hou, X. Li, J.-H. Yang // Oxid Med Cell Longev. – 2022. – Vol. 2022. – P. 2590198.
- 123. Wong C. Facile method of quantification for oxidized tryptophan degradants of monoclonal antibody by mixed mode ultra performance liquid chromatography / C. Wong, C. Strachan-Mills, S. Burman // Journal of Chromatography A. – 2012. – Vol. 1270. – P. 153–161.
- 124. Finley E.L. Radiolysis-induced oxidation of bovine alpha-crystallin / E.L. Finley, J. Dillon, R.K. Crouch, K.L. Schey // Photochem Photobiol. – 1998. – Vol. 68, № 1. – P. 9–15.
- 125. Waterfall A.H. Acute acidosis elevates malonaldehyde in rat brain in vivo / A.H. Waterfall, G. Singh, J.R. Fry, C.A. Marsden // Brain Research. 1996. Vol. 712, № 1. P. 102–106.
- 126. Frassetto L.A. How metabolic acidosis and oxidative stress alone and interacting may increase the risk of fracture in diabetic subjects / L.A. Frassetto, A. Sebastian // Medical Hypotheses. – 2012. – Vol. 79, № 2. – P. 189–192.
- 127. Liguori I. Oxidative stress, aging, and diseases / I. Liguori, G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, P. Abete // CIA. 2018. Vol. Volume 13. P. 757–772.
- 128. Simon R.P. Brain acidosis induced by hypercarbic ventilation attenuates focal ischemic injury / R.P. Simon, M. Niro, R. Gwinn // J Pharmacol Exp Ther. – 1993. – Vol. 267, № 3. – P. 1428– 1431.
- 129. Aryal D. Chronic Metabolic Acidosis Elicits Hypertension via Upregulation of Intrarenal Angiotensin II and Induction of Oxidative Stress / D. Aryal, T. Roy, J.C. Chamcheu, K.E. Jackson // Antioxidants. 2020. Vol. 10, № 1. P. 2.

- Tasman W. Duane's Clinical Ophthalmology / W. Tasman, E.A. Jaeger. Lippincott Raven, 2012.
- 131. van Heyningen R. Experimental studies on cataract / R. van Heyningen // Invest Ophthalmol Vis Sci. 1976. Vol. 15, № 9. P. 685–697.
- 132. Flaxman S.R. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis / S.R. Flaxman, R.R.A. Bourne, S. Resnikoff, P. Ackland, T. Braithwaite, M.V. Cicinelli, A. Das, J.B. Jonas, J. Keeffe, J.H. Kempen, J Leasher., H. Limburg, K. Naidoo, K. Pesudovs, A. Silvester, G.A. Stevens, N. Tahhan, T.Y. Wong, H.R. Taylor // The Lancet Global Health. 2017. Vol. 5, № 12. P. e1221–e1234.
- 133. Bonting S.L. Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. VI. Its role in cation transport in the lens of cat, calf and rabbit / S.L. Bonting, L.L. Caravaggio, N.M. Hawkins // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1963. Vol. 101, № 1. P. 47–55.
- 134. Goodenough D.A. Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy / D.A. Goodenough, J.S. Dick, J.E. Lyons // The Journal of cell biology. – 1980. – Vol. 86, № 2. – P. 576–589.
- 135. Wood A.M. UV Filters in Human Lenses: Tryptophan Catabolism / A.M. Wood, R.J.W. Truscott // Experimental Eye Research. 1993. Vol. 56, № 3. P. 317–325.
- 136. Tamara S.O. Spatial distribution of metabolites in the human lens / S.O. Tamara, L.V. Yanshole, V.V. Yanshole, A.Zh. Fursova, D.A. Stepakov, V.P. Novoselov, Yu.P. Tsentalovich // Experimental Eye Research. 2016. Vol. 143. P. 68–74.
- 137. Tsentalovich Y.P. Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses / Y.P. Tsentalovich, T.D. Verkhovod, V.V. Yanshole, A.S. Kiryutin, L.V. Yanshole, A.Zh. Fursova, D.A. Stepakov, V.P. Novoselov, R.Z. Sagdeev // Experimental Eye Research. 2015. Vol. 134. P. 15–23.
- 138. **Yanshole V.V.** Quantitative metabolomic analysis of changes in the lens and aqueous humor under development of age-related nuclear cataract / V.V. Yanshole, L.V. Yanshole, O.A. Snytnikova, Y.P. Tsentalovich // Metabolomics. 2019. Vol. 15, № 3. P. 29.
- 139. Sweeney M.H.J. An Impediment to Glutathione Diffusion in Older Normal Human Lenses: a Possible Precondition for Nuclear Cataract / M.H.J. Sweeney, R.J.W. Truscott // Experimental Eye Research. – 1998. – Vol. 67, № 5. – P. 587–595.
- 140. **Bova L.M.** Major changes in human ocular UV protection with age / L.M. Bova, M.H. Sweeney, J.F. Jamie, R.J. Truscott // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001. Vol. 42, № 1. P. 200–205.
- 141. **Reddy V.N.** Glutathione and its function in the lens—An overview / V.N. Reddy // Experimental Eye Research. 1990. Vol. 50, № 6. P. 771–778.
- 142. Varma S.D. Protection against Superoxide Radicals in Rat Lens / S.D. Varma, T.K. Ets, R.D. Richards // Ophthalmic Res. 1977. Vol. 9, № 6. P. 421–431.
- 143. **Niki E.** Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals / E. Niki // The American Journal of Clinical Nutrition. 1991. Vol. 54, № 6. P. 1119S-1124S.
- 144. Williams D.L. Oxidation, antioxidants and cataract formation: a literature review / D.L. Williams // Veterinary Ophthalmology. 2006. Vol. 9, № 5. P. 292–298.
- 145. Wilmarth P.A. Age-Related Changes in Human Crystallins Determined from Comparative Analysis of Post-translational Modifications in Young and Aged Lens: Does Deamidation Contribute to Crystallin Insolubility? / P.A. Wilmarth, S. Tanner, S. Dasari, S.R. Nagalla, M.A. Riviere, V. Bafna, P.A. Pevzner, L.L. David // J. Proteome Res. – 2006. – Vol. 5, № 10. – P. 2554– 2566.

- 146. **Masters P.M.** Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation / P.M. Masters, J.L. Bada, J.S. Zigler Jrl // Nature. 1977. Vol. 268, № 5615. P. 71–73.
- 147. **Hains P.G.** Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses / P.G. Hains, R.J.W. Truscott // J Proteome Res. 2007. Vol. 6, № 10. P. 3935–3943.
- 148. Ozmen B. Lens superoxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract / B. Ozmen, D. Ozmen, E. Erkin, I. Güner, S. Habif, O. Bayindir // Clin Biochem. 2002. Vol. 35, № 1. P. 69–72.
- 149. **Truscott R.J.W.** Oxidative changes in human lens proteins during senile nuclear cataract formation / R.J.W. Truscott, R.C. Augusteyn // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure. 1977. Vol. 492, № 1. P. 43–52.
- 150. Garner M.H. Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses / M.H. Garner, A. Spector // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980. Vol. 77, № 3. P. 1274–1277.
- 151. MacCoss M.J. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue / M.J. MacCoss, W.H. McDonald, A. Saraf, R. Sadygov, J.M. Clark, J.J. Tasto, K.L. Gould, D. Wolters, M. Washburn, A. Weiss, J.I. Clark, J.R. Yates 3rd. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2002. - Vol. 99, № 12. - P. 7900-7905.
- 152. **Truscott R.J.W.** Changes in human lens proteins during nuclear cataract formation / R.J.W. Truscott, R.C. Augusteyn // Experimental Eye Research. 1977. Vol. 24, № 2. P. 159–170.
- 153. Pirie A. Color and solubility of the proteins of human cataracts / A. Pirie // Invest Ophthalmol. - 1968. - Vol. 7, № 6. - P. 634–650.
- 154. Srivastava O.P. Characterization of Covalent Multimers of Crystallins in Aging Human Lenses / O.P. Srivastava, M.C. Kirk, K. Srivastava // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279, № 12. – P. 10901–10909.
- 155. Wang Z. Human protein aging: modification and crosslinking through dehydroalanine and dehydrobutyrine intermediates / Z. Wang, B. Lyons, R.J.W. Truscott, K.L. Schey // Aging Cell. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 226–234.
- 156. Wang L. Evaluation of crystalline lens and intraocular lens tilt using a swept-source optical coherence tomography biometer / L. Wang, R.G. de Souza, M.P. Weikert, D.D. Koch // Journal of Cataract and Refractive Surgery. 2019. Vol. 45, № 1. P. 35–40.
- 157. **Kanayama T.** The role of the crosslinking amino acid, histidinoalanine, in the human nuclear cataractous lens / T. Kanayama, Y. Miyanaga, K. Horiuchi, D. Fujimoto // Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1987. Vol. 91, № 1. P. 118–121.
- 158. Aquilina J.A. Oxidation Products of 3-Hydroxykynurenine Bind to Lens Proteins: Relevance for Nuclear Cataract / J.A. Aquilina, J.A. Carver, R.J.W Truscott. // Experimental Eye Research. – 1997. – Vol. 64, № 5. – P. 727–735.
- 159. Vazquez S. Novel Protein Modification by Kynurenine in Human Lenses / S. Vazquez, J.A. Aquilina, J.F. Jamie, M.M. Sheil, R.J.W. Truscott // Journal of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277, № 7. P. 4867–4873.
- 160. **Hood B.D.** Human Lens Coloration and Aging / B.D. Hood, B. Garner, R.J.W. Truscott // Journal of Biological Chemistry. 1999. Vol. 274, № 46. P. 32547–32550.
- 161. McNulty R. Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens / R. McNulty, H. Wang, R.T. Mathias, B.J. Ortwerth, R.J.W. Truscott, S. Bassnett // The Journal of Physiology. – 2004. – Vol. 559, № 3. – P. 883–898.
- 162. Bassnett S. Direct measurement of pH in the rat lens by ion-sensitive microelectrodes / S. Bassnett, G. Duncan // Experimental Eye Research. 1985. Vol. 40, № 4. P. 585–590.

- Mathias R.T. Cell to cell communication and pH in the frog lens / R.T. Mathias, G. Riquelme, J.L. Rae // The Journal of general physiology. 1991. Vol. 98, № 6. P. 1085–1103.
- 164. Veselovsky J. The free amino acids and the aqueous humor pH after antiglaucomatics in vitro / J. Veselovsky, Z. Olah, A. Vesela, S. Gressnerova // Bratisl Lek Listy. 2003. Vol. 104, № 1. P. 14–18.
- 165. Rossi M. Changes in Aqueous Humor pH After Femtosecond Laser-Assisted Cataract Surgery / M. Rossi, F. Di Censo, M. Di Censo, M. Al Oum // J Refract Surg. – 2015. – Vol. 31, № 7. – P. 462–465.
- 166. Sobolewska B. pH of anti-VEGF agents in the human vitreous: low impact of very different formulations / B. Sobolewska, P. Heiduschka, K.-U. Bartz-Schmidt, F. Ziemssen // Int J Retin Vitr. 2017. Vol. 3, № 1. P. 22.
- 167. Giasson C. Corneal epithelial and aqueous humor acidification during in vivo contact lens wear in rabbits / C. Giasson, J.A. Bonanno // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 1994. – Vol. 35, № 3. – P. 851–861.
- 168. Giblin F.J. UVA light in vivo reaches the nucleus of the guinea pig lens and produces deleterious, oxidative effects / F.J. Giblin, V.R. Leverenz, V.A. Padgaonkar, N.J. Unakar, L. Dang, L.-R. Lin, M.-F. Lou, V.N. Reddy, D. Borchman, J.P. Dillon // Exp Eye Res. – 2002. – Vol. 75, № 4. – P. 445–458.
- 169. Van Heyningen R. Effect of some cyclic hydroxy compounds on the accumulation of ascorbic acid by the rabbit lens in vitro / R. Van Heyningen // Experimental Eye Research. 1970. Vol. 9, № 1. P. 49–56.
- 170. **Korlimbinis A.** Protein-bound and free UV filters in cataract lenses. The concentration of UV filters is much lower than in normal lenses / A. Korlimbinis, J.A. Aquilina, Truscott R.J.W. // Experimental Eye Research. 2007. Vol. 85, № 2. P. 219–225.
- 171. Zelentsova E.A. Optical properties of the human lens constituents / E.A. Zelentsova, L.V. Yanshole, A.Zh. Fursova, Yu.P. Tsentalovich // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2017. Vol. 173. P. 318–324.
- 172. **Dillon J.** TIME RESOLVED SPECTROSCOPIC STUDIES ON THE INTACT HUMAN LENS / J. Dillon, S.J. Atherton // Photochem & Photobiology. 1990. Vol. 51, № 4. P. 465–468.
- 173. Korlimbinis A. 3-Hydroxykynurenine Oxidizes α-Crystallin: Potential Role in Cataractogenesis / A. Korlimbinis, P.G. Hains, R.J.W. Truscott, J.A. Aquilina // Biochemistry. – 2006. – Vol. 45, № 6. – P. 1852–1860.
- 174. **Krishna C.M.** A STUDY OF THE PHOTODYNAMIC EFFICIENCIES OF SOME EYE LENS CONSTITUENTS / C.M. Krishna, S. Uppuluri, P. Riesz, J.S. Zigler Jr., D. Balasubramanian // Photochem & Photobiology. 1991. Vol. 54, № 1. P. 51–58.
- 175. Tsentalovich Y.P. Photochemistry of Kynurenine, a Tryptophan Metabolite: Properties of the Triplet State / Y.P. Tsentalovich, O.A. Snytnikova, P.S. Sherin, M.D.E. Forbes // J. Phys. Chem. A. - 2005. - Vol. 109, № 16. - P. 3565-3568.
- 176. Tsentalovich Yu.P. Photochemical Properties of UV Filter Molecules of the Human Eye / Yu.P. Tsentalovich, P.S. Sherin, L.V. Kopylova, I.V. Cherepanov, J. Grilj, E. Vauthey // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 52, № 10. – P. 7687.
- 177. Sherin P.S. Ultrafast Excited-State Dynamics of Kynurenine, a UV Filter of the Human Eye / P.S. Sherin, J. Grilj, Yu.P. Tsentalovich, E. Vauthey // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, № 14. P. 4953–4962.
- 178. Tuna D. Mechanisms of Photostability in Kynurenines: A Joint Electronic-Structure and Dynamics Study / D. Tuna, N. Došlić, M. Mališ, A.L. Sobolewski, W. Domcke // J. Phys. Chem. B. - 2015. - Vol. 119, № 6. - P. 2112-2124.

- 179. **Taylor L.M.** UV Filter Instability: Consequences for the Human Lens / L.M. Taylor, J.A. Aquilina, J.F. Jamie, R.J.W. Truscott // Experimental Eye Research. 2002. Vol. 75, № 2. P. 165–175.
- 180. Taylor L.M. Glutathione and NADH, but not Ascorbate, Protect Lens Proteins from Modification by UV Filters / L.M. Taylor, J.A. Aquilina, J.F. Jamie, R.J.W. Truscott // Experimental Eye Research. – 2002. – Vol. 74, № 4. – P. 503–511.
- 181. Kopylova L.V. UV filter decomposition. A study of reactions of 4-(2-aminophenyl)-4oxocrotonic acid with amino acids and antioxidants present in the human lens / L.V. Kopylova, O.A. Snytnikova, E.I. Chernyak, S.V. Morozov, Yu.P. Tsentalovich // Experimental Eye Research. - 2007. - Vol. 85, № 2. - P. 242–249.
- 182. Sherin P.S. Photoactivity of kynurenine-derived UV filters / P.S. Sherin, Yu.P. Tsentalovich, O.A. Snytnikova, R.Z. Sagdeev // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2008. – Vol. 93, № 3. – P. 127–132.

183. Sherin P.S. Photophysics and Photochemistry of the UV Filter Kynurenine Covalently Attached to Amino Acids and to a Model Protein / P.S. Sherin, J. Grilj, L.V. Kopylova, V.V. Yanshole, E. Vauthey, Yu.P. Tsentalovich, // J. Phys. Chem. B. -2010. - Vol. 114, No 36. - P. 11909–11919.

- 184. Parker N.R. Protein-bound kynurenine is a photosensitizer of oxidative damage / N.R. Parker, J.F. Jamie, M.J. Davies, R.J.W. Truscott // Free Radical Biology and Medicine. – 2004. – Vol. 37, № 9. – P. 1479–1489.
- 185. Zelentsova E.A. Photochemistry of aqueous solutions of kynurenic acid and kynurenine yellow / E.A. Zelentsova, P.S. Sherin, O.A. Snytnikova, R. Kaptein, E. Vauthey, Yu.P. Tsentalovich // Photochem Photobiol Sci. – 2013. – Vol. 12, № 3. – P. 546–558.
- 186. Żarnowski T. Elevated Concentrations of Kynurenic Acid, a Tryptophan Derivative, in Dense Nuclear Cataracts / T. Żarnowski, R. Rejdak, E. Zielinska-Rzecka, E. Zrenner, P. Grieb, Z. Zagórski, A. Junemann, W.A. Turski // Current Eye Research. 2007. Vol. 32, № 1. P. 27–32.
- 187. **Pileni M.** ON THE PHOTOSENSITIZING PROPERTIES OF *N* -FORMYLKYNURENINE AND RELATED COMPOUNDS / M. Pileni, R. Santus, E.J. Land // Photochem & Photobiology. 1978. Vol. 28, № 4–5. P. 525–529.
- 188. Zhuravleva Y.S. Acid-alkaline properties of triplet state and radical of kynurenic acid / Y.S. Zhuravleva, Y.P. Tsentalovich // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2018. Vol. 365. P. 7–12.
- 189. Posener M.L. Mechanism of tryptophan oxidation by some inorganic radical-anions: a pulse radiolysis study / M.L. Posener, G.E. Adams, P. Wardman, R.B. Cundall // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. – 1976. – Vol. 72, № 0. – P. 2231.
- 190. Tsentalovich Y.P. Properties of excited states of aqueous tryptophan / Y.P. Tsentalovich, O.A. Snytnikova, R.Z. Sagdeev // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2004. Vol. 162, № 2–3. P. 371–379.
- 191. Saprygina N.N. Oxidation of Purine Nucleotides by Triplet 3,3',4,4'-Benzophenone Tetracarboxylic Acid in Aqueous Solution: pH-Dependence / N.N. Saprygina, O.B. Morozova, T.V. Abramova, G. Grampp, A.V. Yurkovskaya // J. Phys. Chem. A. – 2014. – Vol. 118, № 27. – P. 4966–4974.
- 192. Morozova O.B. Electron transfer vs. proton-coupled electron transfer as the mechanism of reaction between amino acids and triplet-excited benzophenones revealed by time-resolved CIDNP / O.B. Morozova, M.S. Panov, N.N. Fishman, A.V. Yurkovskaya // Phys. Chem. Chem. Phys. 2018. Vol. 20, № 32. P. 21127–21135.

- 193. Zádori D. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies / D. Zádori, P. Klivényi, E. Vámos, F. Fülöp, J. Toldi, L. Vécsei // J Neural Transm. 2009. Vol. 116, № 11. P. 1403–1409.
- 194. Fukuwatari T. Possibility of Amino Acid Treatment to Prevent the Psychiatric Disorders via Modulation of the Production of Tryptophan Metabolite Kynurenic Acid / T. Fukuwatari // Nutrients. - 2020. - Vol. 12, № 5. - P. 1403.
- 195. Wirthgen E. Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions / E. Wirthgen, A. Hoeflich, A. Rebl, J. Günther // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 8. – P. 1957.
- 196. **Sadok I.** Chromatographic analysis of tryptophan metabolites / I. Sadok, A. Gamian, M.M. Staniszewska // J of Separation Science. 2017. Vol. 40, № 15. P. 3020–3045.
- 197. Plitman E. Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis / E. Plitman, Y. Iwata, F. Caravaggio, S. Nakajima, J.K. Chung, P. Gerretsen, J. Kim, H. Takeuchi, M.M. Chakravarty, G. Remington, A. Graff-Guerrero // Schizophrenia Bulletin. 2017. Vol. 43, № 4. P. 764–777.
- 198. Jauch D. Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases / D. Jauch, E.M. Urbańska, P. Guidetti, E.D. Bird, J.P. Vonsattel, W.O. Jr. Whetsell, R. Schwarcz // Journal of the Neurological Sciences. 1995. Vol. 130, № 1. P. 39–47.
- 199. Erhardt S. The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia / S. Erhardt, L. Schwieler, L. Nilsson, K. Linderholm, G. Engberg // Physiology & Behavior. 2007. Vol. 92, № 1–2. P. 203–209.
- 200. Lugo-Huitrón R. On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress / R. Lugo-Huitrón, T. Blanco-Ayala, P. Ugalde-Muñiz, P. Carrillo-Mora, J. Pedraza-Chaverrí, D. Silva-Adaya, P.D. Maldonado, I. Torres, E. Pinzón, E. Ortiz-Islas, T. López, E. García, B. Pineda, M. Torres-Ramos, A. Santamaría, V. Pérez-De La Cruz // Neurotoxicology and Teratology. 2011. Vol. 33, № 5. P. 538–547.
- 201. **Cunningham P.C.** Neurodegeneration and locomotor dysfunction in Drosophila *scarlet* mutants / P.C. Cunningham, K. Waldeck, B. Ganetzky, D.T. Babcock // Journal of Cell Science. 2018. P. jcs.216697.
- 202. Prasanthkumar K.P. A combined experimental and DFT approach on free radical induced oxidations of kynurenic acid / K.P. Prasanthkumar, P.K. Sajith, B.G. Singh // New J. Chem. 2020. Vol. 44, № 43. P. 18858–18866.
- 203. Goda K. Radical Scavenging Properties of Tryptophan Metabolites: Estimation of their Radical Reactivity / K. Goda, Y. Hamane, R. Kishimoto, Y. Ogishi. – Tryptophan, Serotonin, and Melatonin / ed. Huether G. et al. Boston, MA: Springer US, 1999. – Vol. 467. – P. 397–402.
- 204. Walden S.E. Distinguishing Features of Indolyl Radical and Radical Cation: Implications for Tryptophan Radical Studies / S.E. Walden, R.A. Wheeler // J. Phys. Chem. – 1996. – Vol. 100, № 5. – P. 1530–1535.
- 205. Brynda M. Density Functional Theory calculations on the magnetic properties of the model tyrosine radical-histidine complex mimicking tyrosyl radical YD · in photosystem II / M. Brynda, B. R. David // Res. Chem. Intermed. 2007. Vol. 33, № 8. P. 863–883.
- 206. Dixon W.T. Determination of the acidity constants of some phenol radical cations by means of electron spin resonance / W.T. Dixon, D. Murphy // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2. 1976. Vol. 72. P. 1221.
- 207. **Butler J.** Reversibility of charge transfer between tryptophan and tyrosine / J. Butler, E.J. Land, W.A. Prütz, A.J. Swallow // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1986. № 4. P. 348–349.
- 208. **Bobrowski K.** Pulse radiolysis studies of intramolecular electron transfer in model peptides and proteins. 7. Trp• \rightarrow TyrO• radical transformation in hen egg-white lysozyme Effects of pH,

temperature, Trp62 oxidation and inhibitor binding / K. Bobrowski, J. Holcman, J. Poznanski, K.L. Wierzchowski // Biophysical Chemistry. – 1997. – Vol. 63, № 2–3. – P. 153–166.

- 209. **Prűtz W.A.** Direct demonstration of electron transfer between tryptophan and tyrosine in proteins / W.A. Prűtz, J. Butler, E.J. Land, A.J. Swallow // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1980. Vol. 96, № 1. P. 408–414.
- 210. **Faraggi M.** Long-range electron transfer between tyrosine and tryptophan in peptides / M. Faraggi, M.R. DeFelippis, M.H. Klapper // J. Am. Chem. Soc. 1989. Vol. 111, № 14. P. 5141–5145.
- 211. Close D.M. Calculation of Standard Reduction Potentials of Amino Acid Radicals and the Effects of Water and Incorporation into Peptides / D.M. Close, P. Wardman // J. Phys. Chem. A. 2018. Vol. 122, № 1. P. 439–445.
- 212. Davidson V.L. Posttranslational Biosynthesis of the Protein-Derived Cofactor Tryptophan Tryptophylquinone / V.L. Davidson, C.M. Wilmot // Annu. Rev. Biochem. – 2013. – Vol. 82, № 1. – P. 531–550.
- 213. Greene B.L. Ribonucleotide Reductases: Structure, Chemistry, and Metabolism Suggest New Therapeutic Targets / B.L. Greene, G. Kang, C. Cui, M. Bennati, D.G. Nocera, C.L. Drennan, J. Stubbe // Annu. Rev. Biochem. 2020. Vol. 89, № 1. P. 45–75.
- 214. Moody P.C.E. The Nature and Reactivity of Ferryl Heme in Compounds I and II / P.C.E. Moody, E.L. Raven // Acc. Chem. Res. 2018. Vol. 51, № 2. P. 427–435.
- 215. **Prince R.C.** Tryptophan radicals / R.C. Prince, G.N. George // Trends in Biochemical Sciences. 1990. Vol. 15, № 5. P. 170–172.
- 216. Essenmacher C. Tryptophan radical formation in DNA photolyase: electron-spin polarization arising from photoexcitation of a doublet ground state / C. Essenmacher, S.T. Kim, M. Atamian, G.T. Babcock, A. Sancar // J. Am. Chem. Soc. 1993. Vol. 115, № 4. P. 1602–1603.
- 217. Baron A.J. Structure and mechanism of galactose oxidase. The free radical site / A.J. Baron, C. Stevens, C. Wilmot, K.D. Seneviratne, V. Blakeley, D.M. Dooley, S.E. Phillips, P.F. Knowles, M.J. McPherson // J Biol Chem. 1994. Vol. 269, № 40. P. 25095–25105.
- 218. Bobrowski K. Temperature Dependence of Intramolecular Electron Transfer as a Probe for Predenaturational Changes in Lysozyme / K. Bobrowski, J. Holcman, K.L. Wierzchowski // Free Radical Research Communications. – 1989. – Vol. 6, № 4. – P. 235–241.
- 219. Weinstein M. Long range electron transfer between tyrosine and tryptophan in hen egg-white lysozyme / M. Weinstein, Z.B. Alfassi, M.R. DeFelippis, M.H. Klapper, M. Faraggi // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology. 1991. Vol. 1076, № 2. P. 173–178.
- 220. Prütz W.A. Charge transfer in peptides / W.A. Prütz, F. Siebert, J. Butler, E.J. Land, A. Menez, T. Montenay-Garestier // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology. 1982. Vol. 705, № 2. P. 139–149.
- 221. Butler J. Charge transfer between tryptophan and tyrosine in proteins / J. Butler, E.J. Land, W.A. Prütz, A.J. Swallow // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology. 1982. Vol. 705, № 2. P. 150–162.
- 222. **DeFelippis M.R.** Electrochemical properties of tyrosine phenoxy and tryptophan indolyl radicals in peptides and amino acid analogs / M.R. DeFelippis, C.P. Murthy, F. Broitman, D. Weinraub, M. Faraggi, M.H. Klapper // J. Phys. Chem. 1991. Vol. 95, № 8. P. 3416–3419.
- 223. Furuta K. Tryptophan Neutral Radical Brings along Photochemical Crystallization / K. Furuta, Y. Tanizawa, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, T. Okutsu // Chemistry Letters. 2008. Vol. 37, № 4. P. 458–459.
- 224. **Breusing N**. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view/ N. Breusing, T. Grune // Experimental Gerontology. 2010. Vol. 45, № 10. P. 733–737.

- 225. Carreau A. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia / A. Carreau, B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, C. Kieda // J Cell Mol Med. 2011. Vol. 15, № 6. P. 1239–1253.
- 226. **Hunter E.P.L.** The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization / E.P.L. Hunter, M.F. Desrosiers, M.G. Simic // Free Radical Biology and Medicine. 1989. Vol. 6, № 6. P. 581–585.
- 227. Candeias L.P. The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid / L.P. Candeias, P. Wardman, R.P. Mason // Biophys Chem. - 1997. - Vol. 67, № 1-3. - P. 229-237.
- 228. DeGray J.A. Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide / J.A. DeGray, M.R. Gunther, R. Tschirret-Guth, P.R. Ortiz de Montellano, R.P. Mason // J Biol Chem. 1997. Vol. 272, № 4. P. 2359–2362.
- 229. **Thomas A.H.** Photosensitization of bovine serum albumin by pterin: A mechanistic study / A.H. Thomas, C. Lorente, K. Roitman, M.M. Morales, M.L. Dántola // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2013. Vol. 120. P. 52–58.
- 230. Farías J.J. Chemical modification of 5-hydroxytryptophan photoinduced by endogenous sensitizers present in skin / J.J. Farías, P. Lizondo-Aranda, M.P. Serrano, A.H. Thomas, V. Lhiaubet-Vallet, M.L. Dántola // Dyes and Pigments. 2024. Vol. 223. P. 111919.
- 231. Winterbourn C.C. Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides / C.C. Winterbourn, H.N. Parsons-Mair, S. Gebicki, J.M. Gebicki, M.J. Davies // Biochemical Journal. – 2004. – Vol. 381, № 1. – P. 241–248.
- 232. Carroll L. Superoxide radicals react with peptide-derived tryptophan radicals with very high rate constants to give hydroperoxides as major products / L. Carroll, D.T. Pattison, J.B. Davies, R.F. Anderson, C. Lopez-Alarcon, M.J. Davies // Free Radical Biology and Medicine. 2018. Vol. 118. P. 126–136.
- 233. Das A.B. Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radicals to generate a hydroperoxide with subsequent glutathione addition / A.B. Das, T. Nauser, W.H. Koppenol, A.J. Kettle, P. Nagy, C.C. Winterbourn // Free Radical Biology and Medicine. 2014. Vol. 70. P. 86–95.
- 234. Houée-Lévin C. Exploring oxidative modifications of tyrosine: An update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences / C. Houée-Lévin, K. Bobrowski, L. Horakova, B. Karademir, C. Schöneich, M.J. Davies, C.M. Spickett // Free Radical Research. 2015. Vol. 49, № 4. P. 347–373.
- 235. Nakagawa M. 3a-Hydroperoxypyrroloindole from tryptophan. Isolation and transformation to formylkynurenine / M. Nakagawa, S. Kato, S. Kataoka, T. Hino // J. Am. Chem. Soc. 1979. Vol. 101, № 11. P. 3136–3137.
- 236. Gracanin M. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products / M. Gracanin, C.L. Hawkins, P.I. Pattison, M.J. Davies // Free Radical Biology and Medicine. 2009. Vol. 47, № 1. P. 92–102.
- 237. Saito I. Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives / I. Saito, T. Matsuura, M. Nakagawa, T. Hino // Acc. Chem. Res. 1977. Vol. 10, № 9. P. 346–352.
- 238. Ehrenshaft M. Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences / M. Ehrenshaft, L.J. Deterding, R.P. Mason // Free Radical Biology and Medicine. 2015. Vol. 89. P. 220–228.
- 239. Davies M.J. Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals / M.J. Davies, S. Fu, R.T. Dean // Biochemical Journal. 1995. Vol. 305, № 2. P. 643–649.
- 240. Silva E. Light-induced binding of riboflavin to lysozyme / E. Silva, J. Gaule // Radiat Environ Biophys. 1977. Vol. 14, № 4. P. 303–310.

241. Silva E. Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan / E. Silva, R. Ugarte, A. Andrade,

A.M. Edwards // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. -1994. - Vol. 23, No 1. - P. 43–48.

- 242. Dong J. Free-Radical-Mediated Photoinduced Electron Transfer between 6-Thioguanine and Tryptophan Leading to DNA–Protein-Like Cross-Link / J. Dong, C. Huang, S. Guo, Y. Xia, Y. Hou, C. Yang, X. Zhang, J. Jie, B.-Z. Zhu, H. Su // J. Phys. Chem. B. – 2022. – Vol. 126, № 1. – P. 14–22.
- 243. Savina E.D. Influence of viscosity on mechanism and products of radical reactions of kynurenic acid and tryptophan / E.D. Savina, Yu.P. Tsentalovich, P.S. Sherin // Russ Chem Bull. – 2021. – Vol. 70, № 12. – P. 2339–2346.
- 244. Эмануэль Н.М. Экспериментальные методы химической кинетики / Н.М. Эмануэль, М.Г. Кузьмина. Изд-во Московского университета, 1985, с. 255.
- Fabian W.M.F. Substituent effects on absorption and fluorescence spectra of carbostyrils / W.M.F. Fabian, K.S. Niederreiter, G. Uray, W. Stadlbauer // Journal of Molecular Structure. 1999. Vol. 477, № 1–3. P. 209–220.
- 246. Rousseva L.A. Oxindolealanine in age-related human cataracts / L.A. Rousseva, E. Gaillard, D.C. Paik, J.C. Merriam, V. Ryzhov, D.L. Garland, J.P. Dillon // Experimental Eye Research. 2007. Vol. 85, № 6. P. 861–868.
- 247. Nakagawa M. Dye-sensitized photooxygenation of tyrptophan: 3a-Hydroperoxypyrroloindole as a labile precursor of formylkynurenine / M. Nakagawa, S. Kato, K. Nakano, T. Hino // Chem. Pharm. Bull. 1981. Vol. 29, № 4. P. 1013–1026.
- Pileni M.P. Electronic properties of N-formylkynurenine and related compounds / M.P. Pileni,
 P. Walrant, R. Santus // J. Phys. Chem. 1976. Vol. 80, № 16. P. 1804–1809.
- 249. Ibrahim H.R. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function / H.R. Ibrahim, T. Matsuzaki, T. Aoki // FEBS Letters. 2001. Vol. 506, № 1. P. 27-32.
- 250. **Medzihradszky K.F.** In-Solution Digestion of Proteins for Mass Spectrometry / K.F. Medzihradszky. Methods in Enzymology. Elsevier, 2005. Vol. 405. P. 50–65.
- 251. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
- 252. **Никольский Б.П.** Справочник химика, том 1. Общие сведения. Строение вещества. Свойства важнейших веществ / Б.П. Никольский. Лабораторная техника, 1966.
- 253. Sjödin M. Switching the Redox Mechanism: Models for Proton-Coupled Electron Transfer from Tyrosine and Tryptophan / M. Sjödin, S. Styring, H. Wolpher, Y. Xu, L. Sun, L. Hammarström // J. Am. Chem. Soc. – 2005. – Vol. 127, № 11. – P. 3855–3863.
- 254. Glover S.D. Photochemical Tyrosine Oxidation in the Structurally Well-Defined α₃ Y Protein: Proton-Coupled Electron Transfer and a Long-Lived Tyrosine Radical / S.D. Glover, C. Jorge, Li. Liang, K.G. Valentine, L. Hammarström, C. Tommos // J. Am. Chem. Soc. – 2014. – Vol. 136, № 40. – P. 14039–14051.
- 255. **Dongare P.** Direct Evidence of a Tryptophan Analogue Radical Formed in a Concerted Electron–Proton Transfer Reaction in Water / P. Dongare, S. Maji, L. Hammarström // J. Am. Chem. Soc. 2016. Vol. 138, № 7. P. 2194–2199.
- 256. Morozova O.B. Time-Resolved CIDNP Study of Intramolecular Charge Transfer in the Dipeptide Tryptophan-Tyrosine / O.B. Morozova, A.V. Yurkovskaya, Yu.P. Tsentalovich, M.D.E. Forbes, R.Z. Sagdeev // J. Phys. Chem. B. 2002. Vol. 106, № 6. P. 1455–1460.
- 257. Zhang M.-T. Proton-Coupled Electron Transfer from Tryptophan: A Concerted Mechanism with Water as Proton Acceptor / M.-T. Zhang, L. Hammarström // J. Am. Chem. Soc. 2011. Vol. 133, № 23. P. 8806–8809.

- 258. Zhang M.-T. Bimolecular proton-coupled electron transfer from tryptophan with water as the proton acceptor / M.-T. Zhang, J. Nilsson, L. Hammarström // Energy Environ. Sci. 2012. Vol. 5, № 7. P. 7732.
- 259. Barckholtz C. C-H and N-H Bond Dissociation Energies of Small Aromatic Hydrocarbons / C. Barckholtz, T.A. Barckholtz, C.M. Hadad // J. Am. Chem. Soc. 1999. Vol. 121, № 3. P. 491-500.
- 260. Morozova O.B. Kynurenic acid and its chromophoric core 4-hydroxyquinoline react with tryptophan *via* proton-coupled electron transfer, and with tyrosine *via* H-transfer / O.B. Morozova, A.V. Yurkovskaya, P.S. Sherin // Phys. Chem. Chem. Phys. 2021. Vol. 23, № 39. P. 22483–22491.
- 261. Stevenson K.L. Nanosecond UV laser photoionization of aqueous tryptophan: temperature dependence of quantum yield, mechanism, and kinetics of hydrated electron decay / K.L. Stevenson, G.A. Papadantonakis, P.R. LeBreton // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2000. Vol. 133, № 3. P. 159–167.
- 262. Jovanovic S.V. Kinetics and energetics of one-electron-transfer reactions involving tryptophan neutral and cation radicals / S.V. Jovanovic, S. Steenken, M.G. Simic // J. Phys. Chem. – 1991. – Vol. 95, № 2. – P. 684–687.
- Jaureguiàdell J. The disulfide bridges of hen's egg-white lysozyme / J. Jaureguiàdell, J. Jollès,
 P. Jollès // Biochim Biophys Acta. 1965. Vol. 107, № 1. P. 97-111.
- 264. Zhang W. Structure and effective charge characterization of proteins by a mobility capillary electrophoresis based method / W. Zhang, H. Wu, R. Zhang, X. Fang, W. Xu // Chem. Sci. 2019. Vol. 10, № 33. P. 7779–7787.
- 265. Kuehner D.E. Lysozyme Net Charge and Ion Binding in Concentrated Aqueous Electrolyte Solutions / D.E. Kuehner, J. Engmann, F. Fergg, M. Wernick, H.W. Blanch, M. Prausnitz // J. Phys. Chem. – B. 1999. – Vol. 103, № 8. – P. 1368–1374.
- 266. Santus R. Interactions of superoxide anion with enzyme radicals: Kinetics of reaction with lysozyme tryptophan radicals and corresponding effects on tyrosine electron transfer / R. Santus, L.K. Patterson, G.L. Hug, M. Bazin, J.C. Mazière, P. Morlière // Free Radical Research. 2000. Vol. 33, № 4. P. 383–391.
- 267. Bent D.V. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. I. Tyrosine / D.V. Bent, E. Hayon // J. Am. Chem. Soc. 1975. Vol. 97, № 10. P. 2599–2606.
- 268. Hashimoto S. Dimer formation in Radiation-irradiated Aqueous Solution of Lysozyme Studied by Light-scattering-intensity Measurement / S. Hashimoto, H. Seki, T. Masuda, M. Imamura, M. Kondo // International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine. – 1981. – Vol. 40, № 1. – P. 31–46.
- Blázquez-Castro A. Light-initiated oxidative stress / A. Blázquez-Castro, M. Westberg, M. Bregnhøj, T. Breitenbach, D.J. Mogensen, M. Etzerodt, P. Ogilby. Oxidative Stress. Elsevier, 2020. P. 363–388.
- 270. Mizdrak J. Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage / J. Mizdrak, P. Hains, R.J.W. Truscott, J.J. Jamie, M.J. Davies // Free Radical Biology and Medicine. 2008. Vol. 44, № 6. P. 1108–1119.
- 271. Vaish S.P. Photochemistry of acetone in liquid phase studied by CIDNP [chemically induced dynamic nuclear polarization] / S.P. Vaish, R.D. McAlpine, M. Cocivera // J. Am. Chem. Soc. 1974. Vol. 96, № 6. P. 1683–1688.
- 272. Wörner J. Non-classical disproportionation revealed by photo-chemically induced dynamic nuclear polarization NMR / J. Wörner, J. Chen, A. Bacher, S. Weber // Magn. Reson. 2021. Vol. 2, № 1. P. 281–290.

- 273. **Pileni M.P.** KYNURENIC ACID I. SPECTROSCOPIC PROPERTIES / M.P. Pileni, M. Giraud, R. Santus // Photochem & Photobiology. 1979. Vol. 30, № 2. P. 251–256.
- 274. **Egorov S.I.** Photosensitized generation of singlet molecular oxygen by endogenous substances of the eye lens / S.I. Egorov, M.A. Babizhaev, A.A. Krasnovskiĭ Jr, A.A. Shvedova // Biofizika. 1987. Vol. 32, № 1. P. 169–171.
- 275. Merkel P.B. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer / P.B. Merkel, D.R. Kearns // J. Am. Chem. Soc. 1972. Vol. 94, № 21. P. 7244-7253.
- 276. **Matheson I.B.C.** THE QUENCHING OF SINGLET OXYGEN BY AMINO ACIDS AND PROTEINS / I.B.C. Matheson, R.D. Etheridge, N.R. Kratowich, J. Lee // Photochem & Photobiology. -1975. Vol. 21, № 3. P. 165-171.
- 277. Rao P.S. Experimental determination of the redox potential of the superoxide radical •O2- / P.S. Rao, E. Hayon // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1973. Vol. 51, № 2. P. 468-473.
- 278. Morozova O.B. Unravelling structures of radicals of kynurenic acid formed in the photoinduced reactions with tryptophan and *N* -acetyl tyrosine / O.B. Morozova, M.P. Geniman, M.S. Panov, N.N. Fishman, A.V. Yurkovskaya, P.S. Sherin // Phys. Chem. Chem. Phys. 2022. Vol. 24, № 44. P. 27558–27565.
- 279. Ronsein G.E. Characterization of O₂ (¹Δ_g)-derived oxidation products of tryptophan: A combination of tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies / G.E. Ronsein, M.C. Bof de Oliveira, M.H. Gennari de Medeiros, P. Di Mascio // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009. Vol. 20, № 2. P. 188–197.
- 280. Pan X.-M. Oxidation of benzene by the OH radical. A product and pulse radiolysis study in oxygenated aqueous solution / X.-M. Pan, M.N. Schuchmann, C. Von Sonntag // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1993. № 3. P. 289.
ПРИЛОЖЕНИЕ



Рис. ПЗ.1. Кинетические кривые TA, зарегистрированные на длине волны 580 нм после облучения раствора 0.3 мМ КNAH[—] и 10 мМ NTrpH лазерным импульсом (355 нм) при pH 4.2, барботировании кислородом и (A) различных концентрациях PBS, энергия лазерного импульса 10 мДж/импульс; (Б) различных энергиях лазерного импульса, 150 мМ PBS.



Рис. П3.2. Концентрационные зависимости наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) гибели ³KNAH[—] в присутствии NTrpH при pH (A) 3.0 и (Б) 7.0 в небуферных растворах H₂O (черный цвет) и D₂O (красный цвет).



Рис. ПЗ.3. Концентрационные зависимости наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) гибели ³KNAH[—] в присутствии NTyrOH при pH (A) 7.0 и (Б) 3.0 в небуферных растворах H₂O (черный цвет) и D₂O (красный цвет).



Рис. ПЗ.4. Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на 580 нм после облучения лазерным импульсом (355 нм, 13 мДж/импульс) растворов 0.3 мМ КNAH[—] и (А) 10 мМ LTrpH (Б) 2 мМ NTrpHOMe в 150 мМ PBS, при различных значениях рН и барботировании растворов аргоном.



Рис. II4.1. Изменение концентраций КNAH[—] и NTyrOH (верхний ряд, А1-Г1), LTrpH (средний ряд, А2-Г2) и NTrpHOMe (нижний ряд, А3-Г3) относительно своих начальных значений (С₀) при анаэробном УФ-А-фотолизе растворов, содержащих 0.3 мМ KNAH[—] и 4.0 мМ NTyrOH или 1.0 мМ LTrpH или 1.0 мМ NTrpHOMe в 150 мМ PBS при pH (А1-А3) 3.0-3.2, (Б1-Б3) 4.6-4.9, (В2, В3) 5.5 и (Г1-Г3) 7.0-7.4. Каждая точка отражает среднее значение и стандартное отклонение, полученные в трех независимых экспериментах.

Таблица П4.1. Значения квантовых выходов распада КNAH⁻, $\Phi_{deg}(KNAH^-)$, и аминокислот (AK), $\Phi_{deg}(AK)$, и соотношения $\Phi_{deg}(AK)/\Phi_{deg}(KNAH^-)$ при различных значениях pH. Средние значения ± стандартное отклонение представляют собой результаты трех независимых экспериментов.

АК	pН	$\Phi_{\rm deg}({ m KNAH^-})/\%$	$\Phi_{deg}(AK)$ /%	$\Phi_{deg}(AK)/\Phi_{deg}(KNAH^{-})$
	3.0	3.4±0.5	11.6±1.7	3.4
NTyrOH	4.6	2.8 ± 0.4	11.3±1.7	4.0
	7.4	3.3±0.5	12.3±1.9	3.7
	3.0	2.0±0.3	5.3±0.8	2.7
LTrpH	4.9	3.9±0.6	8.9±1.3	2.3
	5.5	3.7±0.4	8.6±1.3	2.3
	7.4	3.9±0.6	8.7±1.3	2.2
	3.0	2.3±0.3	6.8±1.0	3.0
NTroll	4.9	$2.9{\pm}0.4$	8.1±1.2	2.8
N 11p11	5.5	$5.4{\pm}0.8$	15.7±2.4	2.9
	7.4	6.5 ± 1.0	17.2±2.6	2.6
	3.0	2.1±0.3	5.3±0.8	2.5
NTroUOMo	4.9	3.9±0.6	10.3±1.5	2.6
приоме	5.5	3.8±0.6	11.5±1.7	3.0
	7.4	4.7±0.7	11.5 ± 1.7	2.4



Рис. II4.2. Зависимости концентраций некоторых продуктов анаэробного УФ-А-фотолиза от времени облучения растворов, содержащих 0.3 мМ КNAH[—] и 1.0 мМ NTrpH при различных значениях pH: (А-Г) дезоксигенированные продукты деградации KNAH[—]: (А) 1,4-DHQ, (Б) 4HQN, (В) ddO-KNA1 и (Г) ddO-KNA2; (Д, Е) димерные кросс-сшивки NTrpH с RT (Д) 17.4 мин и (Г) 21.4 мин.

NTyrOH



Рис. П4.3. Влияние pH на концентрацию продуктов, образующихся после окончания УФ-А фотолиза 0.3 мМ КNAH[—] и 4.0 мМ NTyrOH (верхний ряд), 1.0 мМ LTrpH (средний ряд), 1.0 мМ NTrpHOMe (нижний ряд): A1-A3 – продукты деградации KNAH[—], Б2 и Б3 – однократно оксигенированные формы TrpH и NNFK; B1-B3 димеры аминокислот, пронумерованные в соответствии с их RT.



Рис. П4.4. Динамика концентраций (А-В) однократно оксигенированных продуктов NTrpH и (Г) NNFK во время проведения анаэробного УФ-А-фотолиза растворов 0.3 мМ KNAH[—] и 1.0 мМ NTrpH в 150 мМ PBS при различных значениях pH.

Расчёт константы скорости реакции между KNAH2°-/KNAH3° и Trp°/TrpH°+

Кинетические кривые TA, зарегистрированные на 470 нм (Рис. 4.5), были аппроксимированы расчётными кривыми с помощью следующей модели:

$$KNAH_{2}^{\bullet-}/KNAH_{3}^{\bullet} + Trp^{\bullet}/TrpH^{\bullet+} \rightarrow KNAH^{-} + TrpH (+ H^{+}), \quad k_{O\Pi \ni}$$
(ПЗ.1)
$$KNAH_{2}^{\bullet-}/KNAH_{3}^{\bullet} + Trp^{\bullet}/TrpH^{\bullet+} \rightarrow продукты, \qquad k_{прод}$$
(ПЗ.2)

Trp'/TrpH'+
$$\rightarrow$$
 димеры TrpH, k_d (П3.3)

Согласно реакциям (ПЗ.1-ПЗ.3), кинетические кривые KNAH₂[•]/KNAH₃[•] и Trp[•]/TrpH^{•+} могут быть рассчитаны с помощью следующих дифференциальных уравнений:

$$\frac{d[KNAH_2^{\bullet-}]}{dt} = -k_R[KNAH_2^{\bullet-}][Trp^{\bullet}]$$
(II3.4)

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{Trp}^{\bullet}]}{\mathrm{dt}} = -k_{\mathrm{R}}[\mathrm{KNAH}_{2}^{\bullet-}][\mathrm{Trp}^{\bullet}] - 2 \cdot k_{\mathrm{d}}[\mathrm{Trp}^{\bullet}]^{2}$$
(II3.5)

Искомыми параметрами аппроксимации были начальная концентрация радикалов KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] и Trp[•]/TrpH^{•+} (C_R) и сумма констант скорости k_{ОПЭ} и k_{прод}, k_R = k_{ОПЭ} + k_{прод}. Кинетические кривые TA были аппроксимированы с помощью поиска минимума суммы квадратов отклонений между экспериментальными и расчётными кривыми. Следующие параметры были взяты из литературных источников и зафиксированы в ходе расчетов:

1) $k_d(LTrp^{\bullet}) = 2.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}, k_d(NTrp^{\bullet}) = 3.0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}, k_d(NTrpOMe^{\bullet}) = 3.2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}, [106]$ были приняты константами при всех использованных значениях pH;

2) $\epsilon_{470}(\text{Trp}^{\bullet}) = 1550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ } \text{ } \epsilon_{470}(\text{TrpH}^{\bullet+}) = 940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ } [65]; \epsilon_{470}(\text{KNAH}_2^{\bullet-}) = 1230 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ } \text{ } \text{ } \epsilon_{470}(\text{KNAH}_3^{\bullet}) = 1560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ } [188];$

4) длина оптического пути детектирующего луча l = 0.8 см.

Расчётные кинетические кривые ТА представлены в виде гладких кривых на Рис. 4.5 основного текста.



Рис. П4.5. Зависимости расчётных параметров, полученных в результате аппроксимации кинетических кривых ТА схемой реакций 4.1, 4.2, 4.7 (см. основной текст), от энергии лазерного импульса. (А) Начальная концентрация радикалов, C_R , и (Б) $k_R = k_{O\Pi \Im} + k_{прод}$. Данные приведены для NTrpHOMe, pH 7.4.



Рис. П4.6. (А, Б) Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на 500 нм после лазерного облучения (355 нм, 3 мДж/импульс) растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 5.5 мМ NTrpH при pH (А) 7.4 и (Б) 4.9 в условиях барботирования аргона, воздуха и кислорода через растворы. Гладкие кривые, выделенные черным цветом, являются расчётными кинетическими кривыми, полученными при аппроксимировании экспериментальных данных схемой реакций, описанной ниже. (В) Зависимость наблюдаемой константы скорости (k_2) от концентрации O₂ в растворе (0.01, 0.28 и 1.4 мМ при барботировании аргона, воздуха и кислорода, соответственно) при pH 4.9 и 7.4.

Расчёт константы скорости реакции между KNAH₂ —/KNAH₃ и молекулярным

кислородом

Кинетические кривые ТА были аппроксимированы с помощью следующей модели:

³KNAH⁻ + NTrpH
$$\rightarrow$$
 KNAH²^{•-} + NTrp[•] k_q (NTrpH) (II4.2)

$$KNAH_2^{\bullet-} + {}^{3}O_2 \rightarrow KNAH^{-} + H^{+} + O_2^{\bullet-} \qquad k(O_2) \qquad (\Pi 4.3)$$

NTrp' + NTrp'
$$\rightarrow$$
 димеры NTrpH k_d (П4.4)

Система дифференциальных уравнений, соответствующая данной кинетической схеме, не имеет аналитического решения. Реакции П4.1-П4.3 следует рассматривать как псевдомономолекулярные по причине высоких концентраций O₂ и NTrpH по сравнению с концентрациями ³KNAH[—] и KNAH₂^{•—}. Реакция П4.4 протекает значительно медленнее по сравнению с реакциями П4.1-П4.3. Для временной шкалы, на которой происходила аппроксимация кинетических кривых, вклад реакции П4.4 можно представить в виде мономолекулярной реакции П4.5:

NTrp'
$$\rightarrow$$
 димеры NTrpH k_d ' (П4.5)

Данное упрощение позволяет свести схему соответствующих дифференциальных уравнений к схеме, имеющей аналитическое решение. В этом случае концентрации реагирующих промежуточных продуктов можно выразить как:

$$[KNAH_{2}^{\bullet-}] = [{}^{3}KNAH^{-}]_{0} \cdot \frac{k_{1}}{k_{1}-k_{2}} \cdot (e^{-k_{2}\cdot t} - e^{-k_{1}\cdot t})$$
(II4.6)

$$[NTrp'] = [{}^{3}KNAH^{-}]_{0} \cdot \frac{k_{1}}{k_{1} - k'_{d}} \cdot (e^{-k'_{d} \cdot t} - e^{-k_{1} \cdot t})$$
(II4.7)

где $k_1 = k_q(NTrpH) \times C(NTrpH)$, $k_2 = k(O_2) \times C(O_2)$, $[^3KNAH^-]_0=[^3KNAH^-](t=0)$. Наблюдаемое изменение сигнала ТА ($\Delta A(t)$) на длине волны 500 нм можно выразить следующим образом:

$$\Delta A(t) = C_2 \times \frac{k_1}{k_1 - k_2} \cdot \left(e^{-k_2 \cdot t} - e^{-k_1 \cdot t} \right) - C_3 \times \frac{k_1}{k_1 - k'_d} \cdot \left(e^{-k'_d \cdot t} - e^{-k_1 \cdot t} \right)$$
(II4.8)

где C_i=[³KNAH⁻]₀ × ε_i × *l*, и ε_i является коэффициентом экстинкции KNAH₂·-/KNAH₃· на 500 нм в случае i = 2 и NTrp[•] в случае i = 3; *l* — длина оптического пути детектирующего луча. В уравнении (П4.8) вклад ³KNAH⁻ не учитывался из-за слабого поглощения этой частицы на 500 нм.

Таким образом, для аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (П4.8) использовалась модель с пятью параметрами (C₂, C₃, k₁, k₂ и k_d'). Наилучшие результаты аппроксимации показаны в виде гладких кривых, выделенных черным цветом на Рис. П4.6 (А, Б). Правильность выбранной модели подтверждается линейным увеличением значения k₂ в зависимости от концентрации O₂ (Рис. П4.6 (В)) и независимостью значений k₁ и k_d' от концентрации O₂ (данные не показаны). С помощью линейной аппроксимации k₂(C(O₂)) были получены следующие значения: $k(O_2) = (2.3 \pm 0.3) \times 10^9$ М⁻¹с⁻¹ для pH 4.9 и (2.0 ± 0.3) × 10⁹ М⁻¹с⁻¹ для pH 7.4. Последнее значение хорошо согласуется со значением, ранее измеренным для раствора при pH 7 [25].



Рис. П5.1. (А) Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на 600 нм после лазерного облучения (355 нм, 13 мДж/импульс) водных растворов, содержащих 0.3 мМ КNAH[—] и различных концентраций HEWL при pH 4.9, 30 мМ PBS и барботировании аргона через раствор. (Б) Зависимость наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) от концентрации HEWL при различных значениях pH.

Аппроксимация кинетических кривых гибели радикалов HEWL

Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на 515 нм (Рис. 5.2 (Б)) были аппроксимированы расчётными кинетическими кривыми в соответствии со следующей моделью:

3 KNAH ⁻ \rightarrow HEWL-независимое тушение	k _T	(Пб.1)
3 KNAH ⁻ + HEWL-TrpH \rightarrow KNAH ₂ ·- + HEWL-Trp·	kq	(П6.2)
$\text{KNAH}_2^{\bullet-} + \text{HEWL-Trp}^{\bullet} \rightarrow \text{KNAH}^{-} + \text{H}^+ + \text{HEWL-Trp}^-$	koпэ	(П6.3)
$KNAH_2$ •— + HEWL-Trp• — продукты	Кпрод	(Пб.4)
$\mathrm{KNAH_2}^{\bullet-} + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{KNAH}^- + \mathrm{H}^+ + \mathrm{O_2}^{\bullet-}$	k _{O2}	(П6.5)
HEWL-Trp• + O_2 •− → HEWL + O_2 / продукты	ks	(Пб.б)
$\text{HEWL-Trp}^{\bullet} \rightarrow \text{HEWL-TyrO}^{\bullet}$	k _{lret}	(П6.7)
HEWL-Trp [•] + HEWL-Trp [•] → димеры HEWL	k _d	(Пб.8)

Согласно реакциям Пб.1-Пб.8, кинетика гибели KNAH₂•-/KNAH₃• и HEWL-Trp•/HEWL-TrpH•+ может быть описана следующими дифференциальными уравнениями:

$$d[^{3}KNAH^{-}]/dt = -k_{q}[HEWL][^{3}KNAH^{-}] - k_{T}[^{3}KNAH^{-}]$$
(II6.9)

$$d[KNAH_{2}^{\bullet}]/dt = k_{q}[HEWL][^{3}KNAH^{-}] + k_{R}[KNAH_{2}^{\bullet}][HEWL-Trp^{\bullet}] - k_{02}[KNAH_{2}^{\bullet}][O_{2}]$$
(II6.10)

$$d[\text{HEWL-Trp}^{\bullet}]/dt = k'_{q}[\text{HEWL}][^{3}\text{KNAH}^{-}] + k_{R}[\text{KNAH}_{2}^{\bullet}^{-}][\text{HEWL-Trp}^{\bullet}]$$
$$-k_{S}[\text{HEWL-Trp}^{\bullet}][O_{2}^{\bullet}^{-}] - k_{LRET}[\text{HEWL-Trp}^{\bullet}] - 2k_{d}[\text{HEWL-Trp}^{\bullet}]^{2} \qquad (\Pi 6.11)$$

$$d[O_2^{\bullet-}]/dt = k_{O2}[KNAH_2^{\bullet-}][O_2] - k_s[HEWL-Trp^{\bullet}][O_2^{\bullet-}]$$
(II6.12)

где $k_R = k_{O\Pi 3} + k_{прод}$. В использованных условиях ([HEWL] = 1 мМ) ³KNAH⁻ исчезает не только в реакции с HEWL, но и в триплет-триплетной аннигиляции, вклад которой увеличивается с увеличением энергии лазерного импульса. Для учета вклада этого процесса и других реакций ³KNAH⁻ без участия HEWL кинетические кривые гибели ³KNAH⁻ были аппроксимированы моноэкспоненциальной функцией в отсутствие HEWL при каждой использованной энергии лазерного импульса и полученные значения далее использовались в качестве значений k_T в настоящих расчетах. Следует отметить, что триплет-триплетная аннигиляция является реакцией второго порядка, но для простоты дальнейшего анализа данный процесс был описан моноэкспоненциальной функцией, которая удовлетворительно воспроизводит начальный участок кинетической кривой для реакций второго порядка.

Спектры ТА, полученные после гибели ³КNАН[—] в реакции с HEWL (Рис. 5.1 основного текста), свидетельствуют о конкуренции аминокислотных остатков TrpH и TyrOH за ³KNAH[—]. Это означает, что константы скорости реакции образования HEWL-Trp[•] при различных значениях pH отличаются от значений k_q, измеренных в разделе 5.1 основного текста (Рис. П5.1). Константы скорости образования HEWL-Trp[•] (k'_q) были рассчитаны как значения k_q(pH), умноженные на процентное содержание радикалов Trp[•], оцененное с помощью спектров TA (Рис. 5.1) с использованием коэффициентов экстинкции Trp[•]/TrpH^{•+}, TyrO[•] и KNAH₂^{•—}/KNAH₃[•] при соответствующих значениях pH [65,188]. В дальнейших расчетах использовались следующие значения: k'_q: 7.3·10⁸, 1.3·10⁹ и 8.0·10⁸ M⁻¹c⁻¹ для pH 3.1, 4.9 и 7.4, соответственно.

При анализе кинетических кривых, зарегистрированных для растворов при pH 7, искомыми параметрами были начальная концентрация ³KNAH[—], C₀(³KNAH[—]), концентрация остаточного кислорода, C(O₂), и константа скорости k_R. Полученные значения C₀(³KNAH[—]) и C(O₂) показаны на Рис. П5.2 (А) и (Б), соответственно. Усредненное значение C(O₂) = 14.7 мкМ в дальнейшем использовалось для аппроксимации кинетических кривых, зарегистрированных при значениях pH 4.9 и 3.1.

Для кинетических кривых при pH 4.9 и 3.1 искомыми параметрами были начальная концентрация C₀(³KNAH⁻⁻), константа скорости k_R=k_{ОПЭ} + k_{прод} и константа скорости k_s, реакция Пб.6. Следующие параметры были взяты из результатов настоящей работы или литературных источников и зафиксированы в ходе расчетов:

- 1. k₀₂ (pH 7) = $2.0 \cdot 10^9$ M⁻¹c⁻¹, k₀₂ (pH 5.3) = $2.3 \cdot 10^9$ M⁻¹c⁻¹ (см. Раздел 4.5);
- 2. $k_{\rm S}$ (pH 7)= 9·10⁷ M⁻¹c⁻¹ [266];
- 3. k_{LRET} (pH 7) = 1.3·10² с⁻¹, k_{LRET} (pH 4) = 1.2·10² с⁻¹, k_{LRET} (pH 3) = 1.9·10² с⁻¹ (LRET − long range electron transfer, см. Раздел 1.5.1) [219];
- 4. $k_d = 4.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (использован для всего диапазона исследованных pH) [266];
- 5. $\varepsilon_{515}(\text{Trp}^{\bullet}) = 1800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \ \varepsilon_{515}(\text{TrpH}^{\bullet+}) = 1800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \ [65],$ $\varepsilon_{515}(\text{KNAH}_2^{\bullet-}) = 2200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \ \varepsilon_{515}(\text{KNAH}_3^{\bullet}) = 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \ [188];$
- 6. длина оптического пути детектирующего луча l = 0.6 см.

Кинетические кривые ТА были аппроксимированы с помощью алгоритма поиска наименьших квадратов для достижения наилучшего согласия между экспериментальными и расчетными данными.



Рис. II5.2. Энергетическая зависимость искомых параметров, полученных в результате численной аппроксимации кинетических кривых, представленных на Рис. 5.2 (Б) основного текста, согласно уравнениям Пб.1-Пб.8. (А) Начальная концентрация ³KNAH⁻, C₀(³KNAH⁻), (Б) концентрация молекулярного кислорода, C(O₂), (В) константа скорости $k_R = k_{O\Pi \ni} + k_{прод} u$ (Г) суммарная константа скорости для комплекса реакций Пб.6, k_s.



Рис. II5.3. SDS-ПААГ(15%)-электрофорез проб, отобранных во время УФ-А фотолиза (355 нм, 3 мДж/импульс, 10 Гц, диаметр луча 7 мм) 0.3 мМ КNАН[—] и 0.35 мМ HEWL при различных рН: (А) рН 3.0, (Б) рН 4.9, (В) рН 7.4; анализ был выполнен для HEWL в количестве 1 мкг/дорожку. Дорожки под номерами 1 для гелей (А, Б) и 5 для геля (В) содержат стандарты молекулярной массы (кДа); дорожки 2–5 для гелей (А, Б) и 1-4 для геля (В), содержат пробы, отобранные после 0, 2, 4 и 8 минут УФ-А фотолиза, соответственно.



Рис. П5.4. Изменение концентраций (А) мономерных и (Б) димерных форм HEWL при анаэробном УФ-А фотолизе 0.3 мМ КNAH[—] и 0.35 мМ HEWL при различных значениях рН раствора. Данные получены с помощью денситометрического анализа гелей SDS-ПААГ(15%), представленных на Рис. 5.4 основного текста и Рис. П5.3 Приложения 7.



Рис. П5.5. SDS-ПААГ(15%)-электрофорез проб, отобранных во время анаэробного УФ-А фотолиза 0.3 мМ KNAH[—] и 0.35 мМ HEWL в буферных растворах при различных рН. Дорожка 1 для обоих гелей содержит стандарты молекулярной массы (кДа); описание условий анализа для проб, содержащихся на дорожках 2-9, приведено в таблицах над изображениями гелей.

Оценка значений копэ и кпрод

Согласно схеме реакций, приведенной в Разделе 5.3, KNAH₂•–/KNAH₃• гибнут в реакциях 5.2–5.4, при этом продукты KNAH⁻ образуются только в реакции 5.3, откуда:

$$\Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^{-}) = \frac{k_{\text{прод}}[\text{HEWL}^{-}]}{k_{0\Pi \exists}[\text{HEWL}^{-}] + k_{\text{прод}}[\text{HEWL}^{-}] + k_{02}[O_2]} = \frac{k_{\text{прод}}[\text{HEWL}^{-}]}{k_{\text{R}}[\text{HEWL}^{-}] + k_{02}[O_2]}$$
(Π8.1)

где [HEWL[•]] и [O₂] — начальные концентрации образовавшихся радикалов HEWL и остаточного кислорода в растворе. Из этого уравнения значения k_{опэ} и k_{прод} можно получить как

$$k_{\text{прод}} = \Phi_{\text{deg}}(\text{KNAH}^{-}) \times (k_{\text{R}} + k_{\text{O2}} \frac{[O_2]}{[\text{HEWL}^{-}]})$$
 (П8.2)

$$\mathbf{k}_{\mathbf{0}\mathbf{\Pi}\mathbf{9}} = \mathbf{k}_{\mathbf{R}} - \mathbf{k}_{\mathbf{п}\mathbf{p}\mathbf{0}\mathbf{d}} \tag{\Pi8.3}$$



Рис. П5.6. Деконволюция масс-спектров в диапазоне 18.5–21.0 мин, полученная при усреднении МС-сигналов мономерных форм HEWL до (А1) и после анаэробного УФ-А-фотолиза 0.3 мМ КNAH[—] и 0.35 мМ HEWL (10 Дж поглощенной энергии) при различных значениях рН: 3.1 (Б1), 4.9 (В1) и 7.4 (Г1). (А2-В2) Нормализованные масс-спектры до и после фотолиза при различных значениях рН.



Рис. П5.7. МС/МС-спектры (верхний) пептида IVSDGNGM¹⁰⁵(+O)NAW¹⁰⁸(+O)VAWR с ионом-предшественником m/z [M+2H⁺]²⁺ 854.3984 и (нижний) IVSDGNGM¹⁰⁵(+O)NAW¹⁰⁸(-2H)VAWR с ионом-предшественником m/z [M+3H⁺]³⁺ 563.9311.

Подобно модификации $W^{108}+O$ (см. Рис. П5.8 (А) Приложения 9), CID-фрагментация пептида IVSDGNGM¹⁰⁵(+O)NAW¹⁰⁸(+O)VAWR приводит к отщеплению молекулы H₂O от W108(+O) и появлению картины фрагментации, схожей с фрагментацией пептида IVSDGNGM¹⁰⁵(+O)NAW¹⁰⁸(-2H)VAWR. Однократное оксигенирование W108 подтверждается значением m/z родительского иона и потерей 2.0156 Да фрагментом W108(+O).

b ион	Пептид	Расчетное значение	Эксперимен- тальное	у ион	Пептид	Расчетное значение	Эксперимен- тальное
		m/z	значение			m/z	значение
		[M+nH] ⁿ⁺	m/z			[M+nH] ⁿ⁺	m/z
			[M+nH]"				[M+nH]"
				y 15 ²⁺	IVSDGNG M(+O)	845.3959	845.3921
					NA <mark>W(-2H)</mark> VAWR		
b4	IVSD	415.2188	415.2206	y14 ²⁺	VSDGNG <mark>M(+O)</mark>	788.8538	788.8508
					NA <mark>W(-2H)</mark> VAWR		
b5	IVSDG	472.2402	472.2375	y13 ²⁺	SDGNG <mark>M(+O)</mark> NA	739.3196	739.3157
					W(-2H)VAWR		
b 6	IVSDGN	586.2832	586.2860	y 12	DGNG <mark>M(+O)</mark> NA	1390.5999	1390.5864
					W(-2H)VAWR		

b 7	IVSDGNG	643.3046	643.2968	y 11	GNG <mark>M(+O)</mark> NA W(-2H)VAWR	1275.5729	1275.5624
bs	IVSDGNG M(+O)	790.3441	789.8506	y 10	NGM(+O)NA W(-2H)VAWR	1218.5515	1218.5519
b9	IVSDGNG M(+O)N	904.3870	904.4028	y 9	GM(+O)NA W(-2H)VAWR	1104.5085	1104.4923
b 10	IVSDGNG M(+O)NA	975.4205	975.4228	y 8	M(+O)NA W(-2H)VAWR	1047.4871	1046.3913*
b 11	IVSDGNG M(+O)NA W(-2H)	1159.4879	1159.4797	y 7	NA <mark>W(-2H)</mark> VAWR	900.4476	900.4408
b ₁₂	IVSDGNG M(+O)NA W(-2H)V	1258.5563	1258.5473	y 6	AW(-2H)VAWR	786.4047	786.4018
b 13	IVSDGNG M(+O)NA W(-2H)VA	1329.5934	1329.5889	y 5	W(-2H)VAWR	715.3676	715.3651
				y 4	VAWR	531.3038	531.3030
b15 ²⁺	IVSDGNG M(+O)NA W(-2H)VA WR	836.3906	836.3911	y 3	AWR	432.2354	432.2360
				y 2	WR	361.1983	361.1972

* Потеря протона (-1.0078 Да) для у-ионов с метионином на N-конце пептидного фрагмента.



Рис. П5.8. Хроматограммы по выделенному ионному току для ионов, соответствующих пептидам (A) $I^{98}VSDGNGMNAW^{108}VAWR^{112}$, (b) $I^{98}VSDGNG(M^{105}+O)NAWVAWR^{112}$, (B) $W^{62}WCNDGR^{68}$, (Г) $G^{117}TDVQAWIR^{125}$ с однократным оксигенированием остатков TrpH (+O, черный цвет) и потерей двух атомов H (-2H, красный цвет) остатками TrpH.



Рис. II5.9. MC/MC-спектры (верхний) пептида IVSDGNGMNAW¹⁰⁸(+O)VAWR с иономпредшественником m/z $[M+2H^+]^{2+}$ 846.4009 и (нижний) пептида IVSDGNGMNAW¹⁰⁸(-2H)VAWR с ионом-предшественником m/z $[M+3H^+]^{3+}$ 558.6004.

СІD-фрагментация пептида с модификацией W108(+O) приводит к потере H₂O и образованию b- и у-ионов, идентичных ионам пептида с модификацией W108(-2H). Модификация +O (+15.9949 Да) для остатка W108 подтверждается значением m/z иона-предшественника и локализацией итоговой модификации -2.0156 Да на W108.

b	Пептид	Расчетное	Эксперимен-	У	Пептид	Расчетное	Эксперимен-
ион		значение	тальное	ион		значение	тальное
		m/z	значение m/z			m/z	значение m/z
		$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$			$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$
_				y15 ²⁺	IVSDGNGMA	837.3964	837.3951
					W(-2H)VAWR		
b 4	IVSD	415.2188	415.2206	y14 ²⁺	VSDGNGMN	780.8543	780.8550
					AW(-H)VAWR		
b 5	IVSDG	472.2402	472.2378	y13 ²⁺	SDGNGMN	731.3201	731.3145
					AW(-H)VAWR		
b ₆	IVSDGN	586.2832	586.2789	y 12	DGNGMN	1374.6009	1374.5904
					A <mark>W(-H)</mark> VAWR		
b 7	IVSDGNG	643.3046	643.3085	y 11	GNGMN	1259.5739	1259.5746
					A <mark>W(-H)</mark> VAWR		
b ₈	IVSDGNGM	774.3451	774.3372	y 10	NGMN	1202.5525	1202.5596

166

					A <mark>W(-H)</mark> VAWR		
b9	IVSDGNGMN	888.3880	888.3821	y 9	GMN A <mark>W(-H)</mark> VAWR	1088.5095	1088.5074
b 10	IVSDGNGMN A	959.4215	959.4326	y 8	MN A <mark>W(-H)</mark> VAWR	1031.4880	1030.4042*
b ₁₁	IVSDGNGMN A <mark>W(-2H)</mark>	1143.4889	1143.4860	y 7	N A <mark>W(-H)</mark> VAWR	900.4476	900.4465
b ₁₂	IVSDGNGMN A <mark>W(-2H)</mark> V	1242.5573	1242.5545	y 6	AW(-H)VAWR	786.4047	786.4062
				y 5	W(-2H)VAWR	715.3676	715.3663
				y 4	VAWR	531.3038	531.3029
b ₁₅ ²⁺	IVSDGNGMN A <mark>W(-H)</mark> VAWR	828.3911	828.3907	y 3	AWR	432.2354	432.2359
				y 2	WR	361.1983	361.2000

* Потеря протона (-1.0078 Да) для у ионов с метионином на N-конце пептидного фрагмента.



Рис. П5.10. MC/MC-спектры (верхний) $W^{62}(+O)WCNDGR$ с ионом-предшественником m/z [M+2H⁺]²⁺ 505.2032 и (нижний) $W^{62}(-2H)WCNDGR$ с ионом-предшественником m/z [M+2H⁺]²⁺ 496.1959.

СІD-фрагментация пептида с модификацией W62(+O) приводит к потере H₂O и образованию bи у-ионов, аналогично образованию ионов пептида с модификацией W108(-2H), см. Рис. П18 Приложения 9. Модификация W62(+O) (+15.9949 Да) подтверждается значением m/z ионапредшественника и локализацией итоговой модификации -2.0156 Да на W62.

b	Пептид	Расчетное	Эксперимен-	У	Пептид	Расчетное	Эксперимен-
ион		значение	тальное	ион		значение	тальное
		m/z	значение m/z			m/z	значение m/z
		$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$			$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$
				y 4	NDGR	461.2103	461.2030
				y 5	CNDGR	621.2486	621.2408
				y 6	WCNDGR	807.3279	807.3238
				y6 ²⁺	WCNDGR	404.1679	404.1680
				y7 ²⁺	W(-2H)WCNDGR	496.1995	496.2023
b 2	W(-H)W	371.1504	371.1646				

168



Рис. II5.11. МС/МС-спектр пептида GTDVQAW¹²³(-2H)IR с ионом-предшественником m/z [M+2H⁺]²⁺ 522.2674.

b ион	Пептид	Расчетное	Эксперимен-	У	Пептид	Расчетное	Эксперимен-
		значение	тальное	ион		значение	тальное
		m/z	значение m/z			m/z	значение m/z
		$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$			$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$
				y 7	DVQA <mark>W(-2H)</mark> IR	885.4578	885.4544
				y 6	VQA <mark>W(-2H)</mark> IR	770.4309	770.4166
				y 5	QAW(-2H)IR	671.3625	671.3670
				y 4	AW(-2H)IR	543.3039	543.3095
				y 3	W(-2H)IR	472.2668	472.2668



Рис. П5.12. МС/МС-спектр пептида GTDVQAW¹²³(+KNAH[—])IR с ионом-предшественником m/z [M+2H⁺]²⁺ 616.8511.

b	Пептид	Расчет-	Экспери-	У	Пептид	Расчетное	Экспери-
ион		ное	мен-	ион		значение	ментальное
		значение	тальное			m/z	значение
		m/z	значение			[M+nH]"	m/z
		[M+nH]	m/z ™/ımı				[M+nH] ^{-*}
				2+	CTDVOA	616 7001	616 7969
				y 9	W(+KNAH)IR	010.7001	010.7808
b 4	GTDV	373.1718	373.1644				
b 5	GTDVQ	501.2304	501.2293	y7 ²⁺	DVQA	537.7536	537.7523
					W(+KNAH)IR	1030.5018	1030.5065
				y '7	DVQA		
					W(KNAH ⁻ ,-CO ₂)IR		
b 6	GTDVQA	572.2675	572.2641	y 6 ²⁺	VQAW(+KNAH)IR	480.2401	480.2443
				y' 6	VQA	915.4749	915.4691
				2.	W(KNAH ⁻ ,-CO ₂)IR		
b 7	GTDVQA	945.3732	945.3849	y 5 ²⁺	QAW(KNAH)IR	430.7059	430.7077
b_7^{2+}	W(+KNAH [—])	473.1902	473.2023	y' 5	QA	816.4065	816.4193
					W(KNAH ,-CO ₂)IR	799.3764	799.3749
				y'' 5	$Q(-NH_3)A$		
					W(KNAH ,-CO ₂)IR		
				y4/	AW(KNAH)IR	732.3459	732.3436
				y 4 ²⁺		366.6766	366.6692
				y' 4	AW(KNAH ⁻ ,-CO ₂)IR	688.3479	688.3621
				y 3	W(KNAH ⁻)IK	601.3088	661.2955
				y 3	$W(\mathbf{K} \mathbf{N} \mathbf{A} \mathbf{\Pi}^{-}, -\mathbf{C} \mathbf{U}_{2})\mathbf{I} \mathbf{K}$	017.3108	017.2818



Рис. П5.13. Хроматограммы по выделенному ионному току для иона m/z [M+2H⁺]²⁺ 590.7169, соответствующего пептиду W⁶²(+KNAH⁻⁻)WCNDGR, до и после 8 мин УФ-А фотолиза (355 нм, 10 Гц, 3 мДж/импульс).





Рис. П5.14. МС/МС-спектры пептидов W⁶²(+KNAH[—])WCNDGR с ионом-предшественником m/z [M+2H⁺]²⁺ 590.7169, (верхний спектр) RT 17.1 и (нижний спектр) 19.3 мин.

b	Пептид	Расчетное	Экспери-	у	Пептид	Расчетное	Экспери-
ион		значение	мен-	ион		значение	мен-
		m/z	тальное			m/z	тальное
		[M+nH] ⁿ⁺	значение			[M+nH] ⁿ⁺	значение
			m/z				m/z
			$[M+nH]^{n+}$				$[M+nH]^{n+}$
				y 4	CNDGR	461.2103	461.2162
				y 5	CNDGR	621.2486	621.2464
				y 6	WCNDGR	807.3279	807.3303
				y7 ²⁺	W(+KNAH)W	590.7248	590.7285
					CNDGR	568.7258	568.7275
				y'7 ²⁺	$W(+KNAH^{-},-CO_2)W$		
					CNDGR		
b 2	W(+KNAH)	560.2087	560.2112				
b' 3	W(+KNAH ,-CO ₂) WC	676.2412	676.2320				



Рис. П5.15. MC/MC-спектры кросс-сшивки $Tyr(-H)OH^{23}$ – $Tyr(-H)OH^{53}$ между пептидами (G<u>Y²³</u>SLGNWVCAAK) (NTDGSTD<u>Y⁵³</u>GILQINSR) с ионом-предшественником m/z [M+4H⁺]⁴⁺ 769.8664.

у Ион	Пептид	Расчетное значение m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксперимен- тальное значение m/z [M+nH] ⁿ⁺	у Ион	Пептид	Расчетное значение m/z [M+nH] ⁿ⁺	Эксперимен- тальное значение m/z [M+nH] ⁿ⁺
				y10 y10 ²⁺	SLGNWVCAAK	1105.5536 553.2805	1105.5367 553.2780
y 8	GILQINSR	900.5262	900.5134	y 9	LGNWVCAAK	1018.5215	1018.4889
y 7	ILQINSR	843.5047	843.5062	y 8	GNWVCAAK	905.4375	905.4308
y6 y6 ²⁺	LQINSR	730.4207 365.7143	730.4174 365.7180	y 7	NWVCAAK	848.4160	848.4086
y 5	QINSR	617.3366	617.3255	y 6	WVCAAK	734.3731	734.3604
y 4	INSR	489.2780	489.2712	y 5	VCAAK	548.2938	548.2858
y 3	NSR	376.1940	376.1929	y 4	CAAK	449.2254	449.2110

b	Пептид	Расчетное	Эксперимен-	b	Пептид	Расчетное	Эксперимен-
ион		значение	тальное	ИОН		значение	тальное
		m/z	значение m/z			m/z	значение m/z
		$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$			$[M+nH]^{n+}$	$[M+nH]^{n+}$
b 7 ⁺	NTDGSTD	691.2530	691.2539	b 3 ²⁺	NTDGSTDY ⁵³⁽ GY ²³ S)	1029.9718	1029.9691
					GILQINSR		

173



Рис. П6.1. Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на длине волны 590 нм после лазерного облучения (355 нм) растворов KNAH⁻ в различных концентрациях при (А) рН 6.7, небуферный водный раствор (H₂O) и (Б) рН 7.6, небуферный водный раствор (D₂O). При регистрации кинетических кривых ТА все растворы барботировались аргоном. Гладкие кривые получены при аппроксимации экспериментальных кривых схемой реакций 6.1-6.3.

Расчёт константы скорости реакции между ³КNАН- и КNАН-

Кинетические кривые, зарегистрированные на 590 нм (см. Рис. 6.1 (А) и П6.1 Приложения 10) были аппроксимированы согласно следующей кинетической схеме:

$${}^{3}\text{KNAH}^{-} + {}^{3}\text{KNAH}^{-} \rightarrow (k_{tt})$$
 (II11.1)

$$^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{O}_{2} \rightarrow (\text{k}_{\text{O2}})$$
 (II11.2)

$$^{3}\text{KNAH}^{-} + \text{KNAH}^{-} \rightarrow (k_{q})$$
 (II11.3)

Согласно реакциям (П11.1-П11.3) кривая гибели ³КNАН[—] может быть описана следующим уравнением:

$$\frac{d[{}^{3}KNAH^{-}]}{dt} = -2 \cdot k_{tt} \cdot [{}^{3}KNAH^{-}]^{2} - k_{02} \cdot [{}^{3}KNAH^{-}] \cdot C(O_{2}) - k_{q} \cdot [{}^{3}KNAH^{-}] \cdot C(KNAH^{-})$$
(II11.4)

Данное дифференциальное уравнение имеет аналитическое решение:

$$[^{3}\text{KNAH}^{-}] = [^{3}\text{KNAH}^{-}]_{0} \times \frac{k_{\text{obs}}}{e^{k_{\text{obs}} \cdot t} \cdot (k_{\text{obs}} + 2 \cdot k_{\text{tt}} \cdot [^{3}\text{KNAH}^{-}]_{0}) - 2 \cdot k_{\text{tt}} \cdot [^{3}\text{KNAH}^{-}]_{0}}$$
(II11.5)

где $k_{obs} = k_{O2} \cdot C(O_2) + k_q \cdot C(KNAH^-)$. Для всех использованных водных растворов искомыми параметрами были: начальная концентрация ³KNAH⁻ ([³KNAH⁻]₀), константы скорости k_{obs} и k_{tt} и $\epsilon_{590}(^{3}KNAH^{-})$. Длина оптического пути регистрации поглощения, *l*, составляла 0.7 см.

Значения k_q были рассчитаны по наклонам графиков зависимости k_{obs} от C(KNAH⁻) (см. Рис. 6.1 (Б)), полученных путем линейной аппроксимации данных. Полученные значения $\epsilon_{590}(^{3}\text{KNAH}^{-})$, k_q и k_{tt} представлены в Таблице Пб.1 Приложения 12. Расчетные кинетические кривые представлены в виде гладких кривых на Рис. 6.1 (А) основного текста и Рис. Пб.1 Приложения 10.

Таблица Пб.1. Значения $\epsilon_{590}({}^{3}KNAH^{-})$ и константы скорости k_q и k_{tt} для разных сред. Стандартная ошибка – 20%.

Среда	$k_{tt} / M^{-1}c^{-1}$	$k_q / M^{-1}c^{-1}$	$\epsilon / M^{-1} cm^{-1}$	k_{tt} / ε / см с ⁻¹
150 мM PBS	$2.4 \cdot 10^9$	$6.7 \cdot 10^7$	8 600	$2.8 \cdot 10^5$
H ₂ O	$2.2 \cdot 10^9$	$6.0 \cdot 10^7$	8 800	$2.5 \cdot 10^5$
D_2O	$1.7 \cdot 10^{9}$	$1.6 \cdot 10^7$	10 300	$1.6 \cdot 10^5$





Рис. П6.2. Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на (А) 330 и 590 нм и (Б) 380, 510 и 590 нм для небуферного водного раствора 1.6 мМ КNAH[—] при рН 7.4 после облучения лазерным импульсом (355 нм, 5 мДж) при барботировании раствора аргоном.



Рис. Пб.3. (А) Хроматограммы, зарегистрированные по поглощению на 330 нм, образцов 0.5 мМ КNАН[—] в небуферных водных растворах после анаэробного импульсного УФ-А фотолиза (355 нм, 1 мДж, 20 мин, 10 Гц, диаметр луча 7 мм) с использованием методов ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-УФ-МС. (Б) Хроматограммы по выделенному ионному току для ионов, соответствующих димерам KNAH⁻⁻ (m/z 377.1, красный) и их основным фрагментам (m/z 333.1 и 289.1, оранжевый и зеленый, соответственно), зарегистрированные с помощью метода ВЭЖХ-УФ-МС. (В) Масс-спектры, соответствующие димерам КNAH⁻ с разными RT (0.98, 1.87, 2.11, 2.18 и 2.63 мин). Пять основных димеров KNAH⁻ обозначены как (i), ..., (v) в порядке их элюирования в ВЭЖХ-УФ-МС анализе (Рис. Пб.3 (Б)). Предполагаемое расположение пиков этих димеров в ВЭЖХ-УФ хроматограмме отмечено красным цветом на Рис. Пб.3 (А).



Схема 6.1. Предлагаемая структура одного из димеров KNAH[—] и возможные пути его фрагментации при получении масс-спектра.



Рис. Пб.4. (Верхний ряд) Динамики концентраций идентифицированных димеров KNAH⁻ (RT 14.3, 15.3, 15.6, 16.1 и 17.2 мин), образующихся при анаэробном фотолизе KNAH⁻ под действием лазерного импульсного облучения. Расчет концентраций был произведен с оценкой коэффициента экстинкции димеров KNAH⁻ в максимуме как ε (димер KNAH⁻)_{λ макс.} = 2 · ε (KNAH⁻)_{332 нм} = 2·10⁴ M⁻¹см⁻¹. (Нижний ряд) Спектры поглощения соответствующих димеров.



Рис. П6.5. (Верхний ряд) Динамики концентраций продуктов с RT 18.8, 19.3 и 21.1 мин, образующихся при анаэробном фотолизе KNAH[—] под действием лазерного излучения и излучения лампы. (Нижний ряд) Спектры поглощения соответствующих продуктов.

180
Выход NTrpOOH, образующегося в реакциях между ¹O₂ и NTrp, Ф(NTrpOOH_{сингл.кисл.}), может быть описан следующим уравнением:

$$\Phi$$
(NTrpOOH _{сингл.кисл.}) = Φ (¹O₂)× Φ (¹O_{2 хим.дезакт.})

где $\Phi(^{1}O_{2})$ – доля ³KNAH[—], которые реагируют с O_{2} в реакции 7.7 с образованием $^{1}O_{2}$, а $\Phi(^{1}O_{2 \text{ хим.дезакт.}})$ – доля $^{1}O_{2}$, которая вступает в реакцию с NTrpH с образованием NTrpOOH, реакция 7.9.

Для оценки этих величин были использованы константы скорости реакций, известные из литературы [24,25,188,275,276], и значения концентраций реагентов:

$$\Phi(^1O_2) = \frac{k_q(O_2) \cdot C(O_2)}{k_q(O_2) \cdot C(O_2) + k_q(NTrp) \cdot C(NTrp)} = \frac{2.3 \cdot 10^9 M^{-1} c^{-1} \cdot 1.4 \cdot 10^{-3} M}{2.3 \cdot 10^9 M^{-1} c^{-1} \cdot 1.4 \cdot 10^{-3} M + 2.2 \cdot 10^9 M^{-1} c^{-1} \cdot C(NTrp)}$$

 $\Phi(^{1}O_{2 \text{ XHM, Дезакт.}}) = \frac{k_{\text{XHM}} \cdot C(\text{NTrp})}{k_{\text{pach}} + k_{\text{XHM}} \cdot C(\text{NTrp}) + k_{\phi \text{H3}} \cdot C(\text{NTrp})} = \frac{3 \cdot 10^{7} \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1} \cdot C(\text{NTrp})}{5 \cdot 10^{5} \text{ c}^{-1} + 3 \cdot 10^{7} \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1} \cdot C(\text{NTrp}) + 2 \cdot 10^{7} \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1} \cdot C(\text{NTrp})}$

где k_{xum} – константа скорости химической дезактивации ¹O₂, реакция 7.9, $k_{\phi\mu3}$ – константа скорости физической дезактивации реакции ¹O₂, реакция 7.8, и k_{pacn} – константа скорости мономолекулярной гибели ¹O₂.

Итоговые значения $\Phi(^{1}O_{2})$, $\Phi(^{1}O_{2 \text{ XИМ.дезакт.}})$ и $\Phi(\text{NTrpOOH}_{\text{сингл.кисл.}})$ для 2 и 10 мМ растворов NTrpH показаны в Таблице П7.1.

Таблица П7.1. Расчётные значения $\Phi(^{1}O_{2}), \Phi(^{1}O_{2 \text{ хим.дезакт.}})$ и $\Phi(\text{NTrpOOH}_{\text{сингл.кисл.}}).$

C(NTrpH) / mM	$\Phi(^{1}O_{2}) / \%$	$\Phi(^1\mathrm{O}_{2 ext{ хим.дезакт.}})$ / %	$\Phi(\text{NTrpOOH}_{\text{сингл.кисл.}}) / %$
2	39	10	3.9
10	11	30	3.3



Рис. П7.1. (А) Спектры ТА, зарегистрированные при различных временных задержках после облучения лазерным импульсом (355 нм, 13 мДж) раствора, содержащего 0.3 мМ КNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH, при pH 7.3, при барботировании раствора кислородом. (Б) Те же спектры в меньшем масштабе; сплошными линиями показан спектр Trp[•] [65,189,190], взятый с разными амплитудами для его последующего вычитания из спектров ТА.



Рис. П7.2. Кинетическая кривая TA, зарегистрированная на длине волны 510 нм после облучения раствора 0.3 мМ КNAH[—] и 10 мМ NTrpH лазерным импульсом (355 нм, 6 мДж) при рН 7.3 и барботировании раствора кислородом. Гладкая линия – расчётная кинетическая кривая, соответствующая поглощению NTrp[•], полученная с помощью схемы радикальных реакций 7.1-7.7. Значение C₀(NTrp[•]) в качестве оценки было зафиксировано равным 42 мкМ.

182

Аппроксимация кинетических кривых, зарегистрированных на 510 нм (Схема А1)

Амплитуда начального участка (0–0.3 мкс) кинетической кривой ТА на Рис. П7.2 несколько занижена вследствие систематического артефакта регистрации сигнала ТА. В случае очень быстрой спадающей динамики сигнала на этом участке, как в случае спада сигнала КNAH₂^{•—} на Рис. П7.2 в атмосфере кислорода, данная особенность делает начальную область кинетических кривых непригодной для математического анализа.

Фиксированные параметры:

1.
$$R(\%) = C_0(K1^{\bullet-}) \cdot 100 \% / (C_0(K1^{\bullet-}) + C_0(K2^{\bullet-})) = C_0(K1^{\bullet-}) \cdot 100 / C_0(NTrp^{\bullet}).$$

2.
$$\varepsilon_{510}(\text{NTrp}^{\bullet}) = 1800 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1} [65, 189, 190]$$

3. $k(7.2.K1) = 2.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$, см. Таблицу 4.1 в Главе 4. Стоит отметить, что точное значение константы скорости реакции 7.2.К1 не играет существенной роли в кинетике радикалов в аэробных условиях вследствие быстрого исчезновения K1^{•—} в реакции 7.3.K1.

4. $k(7.3.K1) = 2.0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, см. Раздел 4.5 Главы 4, k(7.3.K2) = 0.

5.
$$k(7.4, 7.5) = 1.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1} [75].$$

6. $k(7.6) = 3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1} [106].$

Кислород, $C(O_2) = 1.4 \, MM$

Фиксированные параметры:

7. $\epsilon_{510}(K1^{\bullet-}) = 2000 M^{-1}cm^{-1}$ [25]. Точное значение $\epsilon_{510}(K1^{\bullet-})$ не влияло на результаты аппроксимации, поскольку область быстрой гибели $K1^{\bullet-}$ не учитывалась в расчетах квадратов отклонений между экспериментальными и расчётными данными (столбец «q» в Таблице П7.2).

Таблица П7.2.

Искомые параметры: $\varepsilon_{510}(K2^{\bullet-})$, k(7.2.K2), C₀(NTrp[•]) = C₀(K1^{•-}) + C₀(K2^{•-}).

Е / мДж	$\epsilon_{510}(K2^{\bullet-}) / M^{-1}cm^{-1}$	$k(7.2.K2) / M^{-1}c^{-1}$	C ₀ (NTrp [•]) / мкМ	q
3	243	$4.3 \cdot 10^{8}$	20.6	$1.00 \cdot 10^{-5}$
6	169	$3.8 \cdot 10^8$	39.9	9.45·10 ⁻⁵
10	174	$3.3 \cdot 10^{8}$	63.7	1.99·10 ⁻⁴

Воздух, $C(O_2) = 280 \, \text{мк} M$

Таблица П7.3.

Искомые параметры: $\varepsilon_{510}(K1^{\bullet-})$, $\varepsilon_{510}(7.2.K2)$, k(7.2.K2), $CO(NTrp^{\bullet}) = C_0(K1^{\bullet-}) + C_0(K2^{\bullet-})$.

Е / мДж	$\epsilon_{510}(K1^{-}) / M^{-1}cm^{-1}$	$\epsilon_{510}(K2^{\bullet-}) / M^{-1}cm^{-1}$	k(7.2.K2) / M ⁻¹ c ⁻¹	С ₀ (NTrp [•]) / мкМ	q
3	3456	432	$6.1 \cdot 10^8$	22.9	8.85.10-5
6	2966	48	9.2·10 ⁷	52.7	1.03.10-5
10	2875	116	$3.5 \cdot 10^8$	81.2	4.08.10-5



Рис. П7.3. Кинетические кривые TA, зарегистрированные на длине волны 510 нм после облучения растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 10 мМ NTrpH лазерными импульсами (355 нм, 3, 6 и 10 мДж) при pH 7.3 и барботировании раствора кислородом (А) и воздухом (Б). Гладкие кривые – расчётные кинетические кривые, соответствующие сумме поглощений K1^{•—}, K2^{•—} и NTrp[•], полученные с помощью Схемы A1 радикальных реакций. (В) Значения C₀(NTrp[•]) для расчётных кривых, представленных на панелях (А) и (Б).

Аппроксимация кинетических кривых, зарегистрированных на 510 нм (Схема А2) Фиксированные параметры:

1.
$$R(\%) = C_0(K1^{\bullet-}) \cdot 100 \% / (C_0(K1^{\bullet-}) + C_0(K2^{\bullet-})) = C_0(K1^{\bullet-}) \cdot 100 / C_0(NTrp^{\bullet}).$$

2. $\epsilon_{510}(\text{NTrp}^{\bullet}) = 1800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} [65, 189, 190].$

3. $\epsilon_{510}(K1^{\bullet-}) = \epsilon_{510}(K2^{\bullet-}) = 2400 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ был найден подбором как наиболее подходящий параметр для R = 50 %, Воздух.

5.
$$k(7.3.K1) = 2.0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$$
, см. Раздел 4.5 Главы 4.

6.
$$k(7.4, 7.5) = 1.2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1} [75].$$

7.
$$k(7.6) = 3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1} [106].$$

8. $k(7.4.A2) = 3.3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}$ был найден подбором как наиболее подходящий параметр для R = 50 %.

Искомые параметры: k(7.3.K2.f), k(7.3.K2.b), C₀(NTrp[•]).

Таблица П7.4. *Кислород*, *С*(*O*₂) = 1.4 м*M*

Е / мДж	$k(7.3.K2.f) / M^{-1}c^{-1}$	k(7.3.K2.b) / c ⁻¹	С ₀ (NTrp [•]) / мкМ	q
3	$1.36 \cdot 10^9$	$5.17 \cdot 10^5$	19.4	1.23.10-4
6	$1.98 \cdot 10^{9}$	$5.69 \cdot 10^5$	37.9	1.03.10-4
10	$1.64 \cdot 10^9$	$9.16 \cdot 10^{5*}$	57.1	2.66.10-4

* значение не использовалось для итогового усреднения.

Таблица П7.5. *Воздух*, *С*(*O*₂) = 280 мк*М*

Е / мДж	$k(7.3.K2.f) / M^{-1}c^{-1}$	k(7.3.K2.b) / c ⁻¹	С ₀ (NTrp [•]) / мкМ	q
3	$2.26 \cdot 10^9$	$4.55 \cdot 10^5$	21.4	7.94·10 ⁻⁵
6	1.98·10 ⁹	5.06·10 ⁵	43.2	1.13.10-4
10	$1.60 \cdot 10^9$	6.63·10 ⁵	65.5	8.62.10-4



Рис. П7.4. Кинетические кривые TA, зарегистрированные на длине волны 510 нм после облучения растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 10 мМ NTrpH лазерными импульсами (355 нм, 3, 6 и 10 мДж) при pH 7.3 и барботировании раствора кислородом (А) и воздухом (Б). Гладкие кривые – расчётные кинетические кривые, соответствующие сумме поглощений K1^{•—}, K2^{•—} и NTrp[•], полученные с помощью Схемы А2 радикальных реакций. (В) Значения C₀(NTrp[•]) для расчётных кривых, представленных на панелях (А) и (Б).

Приложение 17



Рис. II7.5. (А) Кинетическая кривая ТА, зарегистрированная на длине волны 390 нм после облучения раствора 0.3 мМ КNAH[—] и 10 мМ NTrpH лазерным импульсом (355 нм, 10 мДж) при рН 7.3 и барботировании раствора кислородом (серый цвет). Гладкая кривая – расчётная кривая, соответствующая поглощению NTrp[•], полученная с помощью Схемы А2 радикальных реакций (серый цвет). Вычитание расчётной кривой из экспериментальной кривой (красный цвет). (Б, В) Кинетические кривые ТА, зарегистрированные на длине волны 390 нм после облучения растворов 0.3 мМ КNAH[—] и 10 мМ NTrpH лазерными импульсами (355 нм, 3, 6 и 10 мДж) при рН 7.3 и барботировании раствора (Б) кислородом и (В) воздухом. Гладкие кривые – расчётные кривые, соответствующие поглощению К1^{•—}, К2^{•—} и NTrp[•], полученные с помощью Схемы А2 радикальных реакций.

Аппроксимация кинетических кривых, зарегистрированных на 390 нм (Схема А2) Фиксированные параметры:

Параметры R, k(7.2.K1), k(7.2.K2), k(7.3.K1), k(7.4, 7.5), k(7.6), k(7.4.A2) были равны значениям,

использованным при аппроксимации кинетических кривых на 510 нм, Приложение П16.

1.
$$\epsilon_{390}(\text{NTrp}^{\bullet}) = 425 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} [65, 189, 190].$$

2. $k(7.3.K2.f) = 1.8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{c}^{-1}, k(7.3.K2.b) = 5.4 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}, \text{ см. Раздел 7.3 Главы 7.}$

3. C₀(NTrp[•]) были взяты из результатов аппроксимации данных на 510 нм при соответствующих значениях E, см. Приложение П16.

Кислород, $C(O_2) = 1.4 \, MM$

Таблица П7.6. Искомые параметры: $\varepsilon_{390}(K2^{\bullet-})$, $\varepsilon_{390}(NTrpOOH)$ и k(7.6.A2).

Е / мДж	ε ₃₉₀ (К2•−) / М ⁻¹ см ⁻¹	ε ₃₉₀ (NTrpOOH) / М ⁻¹ см ⁻¹	$k(7.6.A2) / c^{-1}$
3*	233	489	$1.17 \cdot 10^4$
6	737	600	$5.48 \cdot 10^4$
10	757	484	$3.94 \cdot 10^4$

* значения не использовалось для итогового усреднения.

Воздух, $C(O_2) = 280$ мкM

Таблица П7.7. Искомые параметры: $\epsilon_{390}(K1^{\bullet-})$, $\epsilon_{390}(K2^{\bullet-})$, $\epsilon_{390}(NTrpOOH)$ и k(7.6.A2).

Е / мДж	ε ₃₉₀ (К1•−) / М ⁻¹ см ⁻¹	ε ₃₉₀ (К2•−) / М ⁻¹ см ⁻¹	$\epsilon_{390}(NTrpOOH) / M^{-1}cM^{-1}$	$k(7.6.A2) / c^{-1}$
3	2410	211*	615	$3.59 \cdot 10^4$
6	2242	577	594	$2.84 \cdot 10^4$
10	2053	688	472	$3.81 \cdot 10^4$

значение не использовалось для итогового усреднения.



Рис. П7.6. Изменение концентраций продуктов фотолиза NTrpH, полученных после 120 с УФ-А фотолиза раствора 0.3 мМ КNAH[—] и 2.0 мМ NTrpH в 30 мМ PBS при энергии импульса 3 мДж, после выдерживания облученных растворов (А) при различных температурах в течение 24 часов и (Б) без/в присутствии NaBH₄ в течение 30 мин. NaBH₄ был добавлен к пробе образца в количестве, эквивалентном содержанию NTrpH(+O,+2O), оцененному в предыдущих экспериментах (Рис. 7.5).



Рис. П7.7. Зависимости концентраций (A) NTrpH(+2O), (Б) NTrpH(+O) и (B) димерных форм (di«RT»)) от времени облучения растворов, содержащих 0.3 мМ KNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH. (A1-B1) Кислород, E = 6 мДж/импульс, (A2-B2) Воздух, E = 6 мДж/импульс.

187

Приложение 18



Рис. II7.8. Процентное соотношение продуктов NTrpH, образованных после 15 с УФ-А фотолиза (355 нм, 6 мДж) 0.3 мМ КNAH[—] и 10.0 мМ NTrpH в условиях барботирования раствора кислородом или воздухом.

Габлица П7.8. Расчетные значения F(реакция	я) для энергии лазерного импульса 6	мДж.
--	-------------------------------------	------

Среда	$F(NTrp^{\bullet} + O_2^{\bullet-})$ %	F(NTrp [•] + NTrp [•]) %	F(K2*-+NTrp*) %	F(K2OO*- + NTrp*) %	F _{deg} (NTrpH) %
Кислород	39	31	19	11	81
Воздух	32	24	40	4	60

Таблица П7.9. Экспериментальные значения F(продукт) и F_{восст}(NTrpH) для энергии лазерного импульса 6 мДж.

Среда	F(NTrpH +O/O ₂) / %	F(diNTrpH) / %	F _{deg} (NTrpH) / %	F _{BOCCT} (NTrpH) / %
Кислород	62	15	79	21
Воздух	51	21	72	28

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы выражает искреннюю благодарность научному руководителю Петру Сергеевичу Шерину за обучение экспериментальным методам, помощь в развитии научного мышления и поддержку на всех этапах длинного совместного пути, начиная от бакалавриата до настоящего момента.

Автор благодарит сотрудников лаборатории протеомики и метаболомики МТЦ СО РАН и её руководителя Юрия Павловича Центаловича за помощь в освоении экспериментальных методов, предоставленную возможность проведения исследований с использованием установки лазерного импульсного фотолиза, а также поддержание дружеской атмосферы на протяжении всего времени работы. Благодарность выражается сотрудникам лаборатории фотохимических радикальных реакций МТЦ СО РАН Ольге Борисовне Морозовой и руководителю лаборатории Александре Вадимовне Юрковской за проведение совместных плодотворных исследований. Автор работы также благодарит сотрудника Отдела сервиса медицинского оборудования МТЦ СО РАН Бориса Васильевича Компанькова за техническую поддержку оборудования для установки лазерного импульсного фотолиза.