

СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ХЛОРАМИНОВЫХ ОКСИДАНТОВ: РЕАКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЕ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СТРУКТУРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГРУППЫ АТОМОВ

© 2019 г. Д.И. Рощупкин* **, В.Л. Сорокин***, Г.Н. Семенкова***,
К.В. Буравлева**, М.А. Мурина**

*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

**Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

***Белорусский государственный университет, 220030, Минск, просп. Независимости, 4, Республика Беларусь

E-mail: marina_murina@mail.ru

Поступила в редакцию 22.12.18 г.

После доработки 22.12.18 г.

Принята к публикации 24.12.18 г.

Разработана методика прямого фотометрического определения констант скоростей окисления дитиотреитола (пример тиолового соединения) N-хлортаурином и N-хлорглицинном и их аналогами, имеющими различную структуру реакционного центра. Рассчитаны зависимости от времени суммы оптической плотности хлораминового оксиданта и оптической плотности дитиана (продукта превращения дитиотреитола) при разных значениях бимолекулярной константы скорости. Искомой величиной принимали значение константы скорости, при которой наблюдалось наилучшее совпадение расчетной кривой и измеряемой кинетической кривой оптической плотности. Активности монохлораминовых оксидантов отличаются мало: константы скорости для N-хлортаурина, N-хлорглицина и N-хлор-2,2-диметилтаурина равны соответственно 170 ± 4 , $235 \pm 9,8$ и $145 \pm 4,3$ $M^{-1}s^{-1}$. При изменении структуры реакционного центра путем введения в хлораминовую группу заместителей атома водорода, активность исследуемых соединений резко трансформируется: константы скорости для N-изопропил-N-хлортаурина, N,N-дихлор-2,2-диметилтаурина и N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурина, определенные способом конкурентной кинетики, составили соответственно $9 \pm 0,5$, 12000 ± 950 и 25300 ± 3000 $M^{-1}s^{-1}$. Реакционная способность N-хлорглицина и структурных аналогов хлорамина таурина по отношению к тиоловым соединениям коррелирует с расчетной величиной заряда активного хлора. Получены предсказания о реакционной способности неизвестных структурных аналогов N-хлораминокислот и N-хлортаурина.

Ключевые слова: оксидант, N-хлортаурин, N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурин, дитиотреитол, спектрофотометрия, константа скорости.

DOI: 10.1134/S0006302919020017

В организме при активации фагоцитов образуются хлораминовые оксиданты, N-хлорпроизводные таурина и аминокислот [1–3]; они обладают противотромботическим [4–8] и противомикробным [8,9–13] свойствами. В основном эти свойства обусловлены способностью по ковалентному механизму (химически) модифицировать в биологически значимых соединениях серосодержащие группы атомов, прежде всего сульфгидрильные и сульфидные [14–18]. Вообще говоря, перспективу стать терапевтической субстанцией имеют те соединения, ко-

торые обладают высокой собственной устойчивостью и характеризуются выраженной избирательностью взаимодействия с молекулярной мишенью. В случае обсуждаемых хлораминовых соединений избирательность взаимодействия определяется соотношением скорости реакции с терапевтической мишенью и скорости побочных реакций. Поэтому для понимания биологических свойств хлораминов таурина и аминокислот совершенно необходимы знания их реакционной способности. Основная коли-

чественная характеристика этой способности – константа скорости реакции.

В последнее время проводятся разработки новых хлораминовых соединений, относящихся к структурным аналогам хлорамина таурина. Одно из направлений этих разработок – создание устойчивых соединений. N-хлортаурин и N,N-дихлортаурин в твердом состоянии достаточно устойчивы [12,19]. Исследователи в США создали их аналог N,N-дихлор-2,2-диметилтаурин с рекордным сроком устойчивости в растворе [13,20]. В наших работах была поставлена задача получить структурные аналоги N-хлортаурина, отличающиеся реакционной способностью по отношению к сульфгидрильной и сульфидной группам атомов. С этой целью в хлораминовую группу вводили ацильные или алкильные заместители атома водорода и тем самым получали оксиданты, имеющие реакционные (функциональные) центры различной структуры [17,21–25].

Задача настоящей работы состояла в определении констант скоростей реакций структурных аналогов хлораминов таурина и глицина с сульфгидрильной группой атомов на примере восстановленного глутатиона и дитиотреитола. Это включало разработку процедуры кинетического контроля реакций и математической обработки. При этом целью работы было выяснение взаимосвязи реакционных свойств и структуры функциональной группы аналогов хлорамина таурина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали коммерческие препараты неорганических солей и гипохлорита натрия (Sigma-Aldrich, США). 2,2-Диметилтаурин был синтезирован по методу, описанному в работе [26]. N-ацетил-2,2-диметилтаурин получен взаимодействием 2,2-диметилтаурина и уксусного ангидрида при нагревании в водном растворе.

Дихлораминовые производные 2,2-диметилтаурина синтезировали введением 2,2-диметилтаурина в раствор гипохлорита (pH 6,25) при постоянном перемешивании в конечном молярном соотношении 1 : 2. Монохлорамин глицина, монохлорамин таурина, хлорамин N-ацетил-2,2-диметилтаурина, монохлорамин 2,2-диметилтаурина получали путем введения гипохлорита натрия в условиях постоянного перемешивания в водные растворы соответственно глицина, таурина, N-ацетил-2,2-диметилтаурина и 2,2-диметилтаурина, молярная концентрация которых превышала концентрацию гипохлорита на 10%. Смесь N-ацетил-2,2-диметилтаурина и гипохлорита имела pH 5,75, для завершения

синтеза эту смесь инкубировали при 6°C в течение 24 ч.

В опытах все соединения растворяли в буферном растворе, содержащем 40 мМ гидрофосфата натрия и 10 мМ дигидрофосфата натрия. Значение pH доводили до 7,4.

Образование хлораминов контролировали по наличию в их спектрах поглощения характерных максимумов (см. ниже). Спектры поглощения хлораминов снимали на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США).

Для квантовомеханических расчетов молекулярных характеристик исследуемых хлораминов использовали программу GAMESS (ChemBio 3D Ultra, CambridgeSoft, США). Моделью растворителя был поляризуемый континуум с диэлектрической постоянной воды. Стартовую конформацию молекул всех хлораминов устанавливали исходя из пространственного расположения атомов хлораминовой группы. Двугранный угол для цепочки атомов «Cl–N–C–C», включающей активный хлор, устанавливали в двух вариантах: 180° и 0°. В случае дихлораминовых структур один атом хлора находился в положении 0°, а другой – 180°. Для оптимизации геометрии и полной энергии применяли метод функционала плотности B3LYP, базисный набор 6-311G(d,p). Поскольку для сопоставления свойств исследуемых хлораминов получаемые величины энергии нельзя использовать вследствие различного элементарного состава, рассчитывали характеристики хлораминовой группы атомов. Расчет включал длины межатомных связей, парциальные атомные заряды Малликена и Лёвдина; заряды выражали в единицах модуля заряда электрона. В настоящей работе использованы средние значения двух расчетов малликеновых зарядов атома хлора (базис B3LYP/6-311G), полученные при указанных выше вариантах старта.

Данные измерения спектров поглощения, кинетических кривых оптической плотности обрабатывали с помощью программы MS Excel. В той же программе проводили статистическую обработку данных и получали уравнение множественной регрессии (множественной корреляции).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кинетический спектрофотометрический анализ реакций умеренных хлораминовых оксидантов с биологически значимыми тиолами. Прямое определение констант скоростей быстрых взаимодействий соединений, как известно, требует для их регистрации применения малоинерционных количественных методов. Среди таких

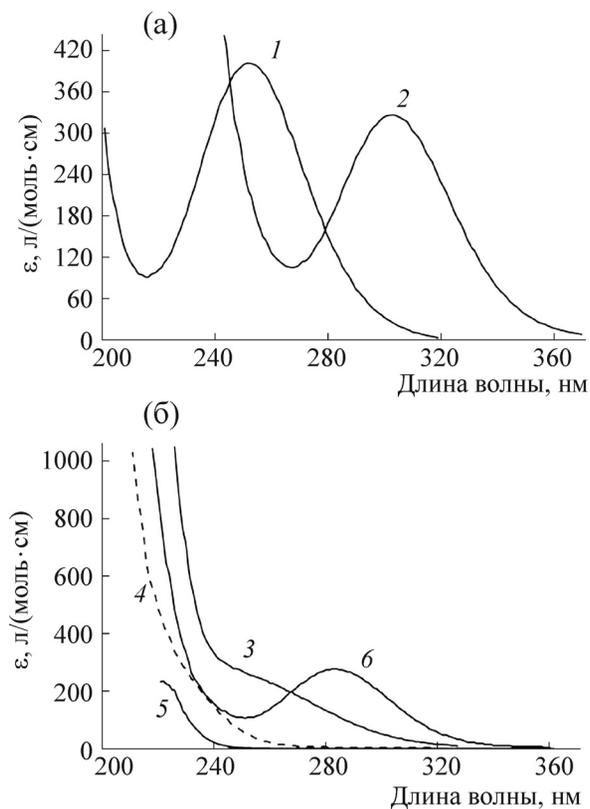


Рис. 1. Спектры поглощения N-хлортаурина (1), N,N-дихлортаурина (2), N-ацетил-N-хлортаурина (3), дитиотреитола (4), метионина (5), дитиана (6); ϵ – молярный коэффициент поглощения.

методов важное место занимает спектрофотометрия. Известно, что хлораминовые производные аминокислот, таурина и их структурных аналогов эффективно поглощают ультрафиолетовое излучение и имеют характерные спектральные полосы поглощения. На рис. 1 показаны спектры поглощения ряда таких соединений, измеренные в настоящей работе. Спектры N-хлортаурина, N,N-дихлортаурина, дитиана (продукта превращения дитиотреитола) по положению максимумов поглощения, величинам молярных коэффициентов поглощения хорошо согласуются с литературными данными [12,18, 27]. Спектр поглощения N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурина отличается наличием слабовыраженной полосы поглощения в диапазоне 240–320 нм (кривая 3), которая ранее была отмечена в спектрах простых N-хлорамидных соединений [28]. Регистрацию уменьшения оптической плотности при 252 нм, как показатель убыли хлорамина таурина, другие исследователи использовали для контроля кинетики реакции с метионином [16].

Мы предприняли попытку, измеряя кинетику уменьшения оптической плотности при

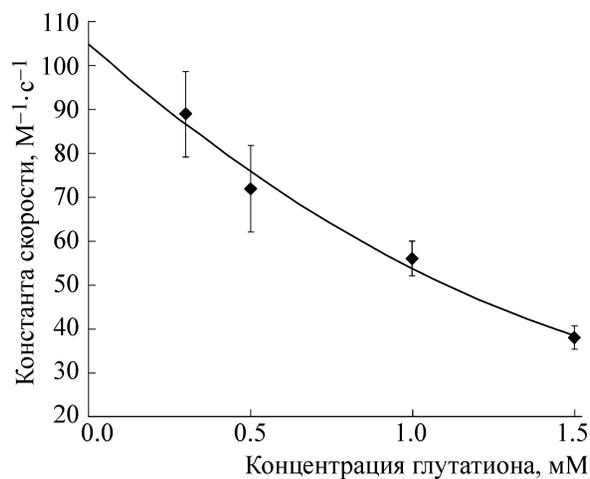


Рис. 2. Формальная бимолекулярная константа скорости реакции хлорамина таурина с восстановленным глутатионом при разных концентрациях. Константы определяли по данным измерений уменьшения оптической плотности при 275 нм.

275 нм, определить константу скорости взаимодействия N-хлортаурина с глутатионом. Важно учитывать, что в ходе этого процесса протекает вторичная реакция: начальный продукт, приобретающий сульфанольную группу ($-SOH$) в результате окисления сульфгидрильной группы [29], реагирует с молекулами глутатиона с образованием окисленного глутатиона, имеющего дисульфидную связь. Спектр поглощения окисленного глутатиона сильно перекрывается со спектром хлорамина таурина. Формально константу скорости рассчитывали, измеряя начальную скорость уменьшения оптической плотности (уменьшение не более 10%). Если принять, что образование окисленного глутатиона не дает существенного вклада в измеряемую оптическую плотность, то угловой коэффициент кинетической кривой равен произведению четырех величин: формальная константа скорости, концентрация хлорамина, его молярный коэффициент поглощения, концентрация восстановленного глутатиона. Оказалось, что константа, определяемая таким формальным образом, – непостоянная величина при варьировании концентрации глутатиона; при ее снижении константа резко увеличивается (рис. 2). Это можно объяснить тем, что вторичная реакция образования окисленного глутатиона, приводящая к увеличению оптической плотности, сильно искажает результат при высокой исходной концентрации тиола. При ее уменьшении вторичная реакция резко замедляется и оказывает меньше влияния. Вероятно, ранее описанное низкое значение [22] константы скорости обсуждаемой реакции отражает эту си-

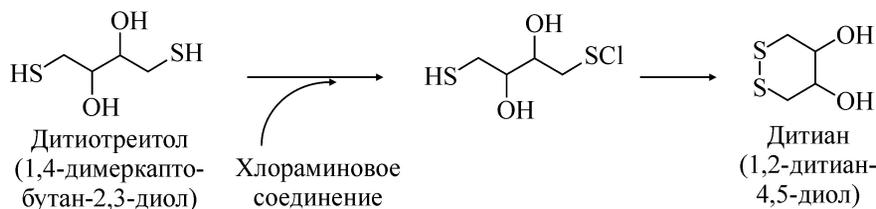


Рис. 3. Упрощенная схема взаимодействия хлораминовых оксидантов с дитиотреитолом с образованием дитиана, имеющего характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области. Продукт превращения оксиданта не показан.

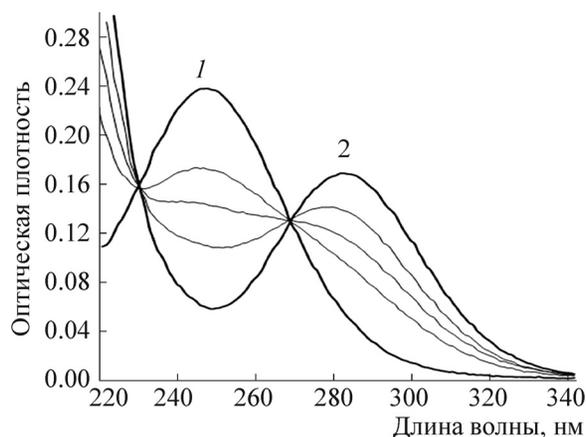


Рис. 4. Спектр поглощения раствора N-хлор-2,2-диметилтаурина (0,7 мМ, кривая 1) и его изменение при введении дитиотреитола. Концентрации добавленного дитиотреитола: 0,7 мМ (кривая 2) и 0,5, 0,35, 0,25 мМ (кривые по порядку сверху вниз). Изобестическая длина волны – 269 нм.

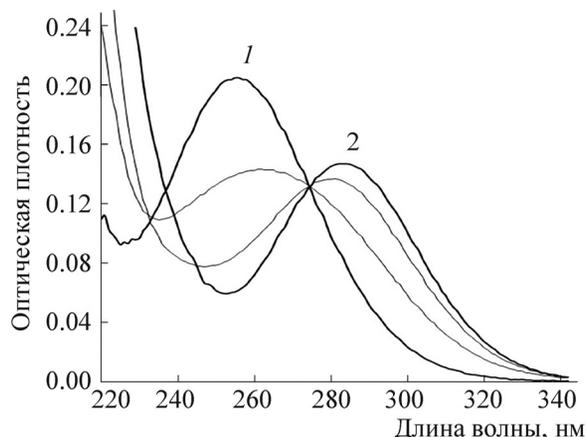


Рис. 5. Спектр поглощения раствора N-хлорглицина (0,5 мМ; кривая 1) и его изменение при введении дитиотреитола. Концентрации дитиотреитола: 1 мМ (кривая 2), 0,45 и 0,3 мМ (кривые по порядку сверху вниз). Изобестическая длина волны – 273,5 нм.

туацию. Зависимость от концентрации глутатиона формальной константы скорости удается хорошо аппроксимировать полиномом второй степени; его экстраполяция до нулевой концентрации глутатиона дает значение константы $105 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (рис. 2). Это величина близка к значению константы скорости, приведенной в работе других авторов [16]. К сожалению, такая процедура определения констант весьма трудоемка, поэтому для выяснения реакционной способности различных структурных аналогов хлорамина таурина по отношению к сульфгидрильной группе было решено исследовать реакции с дитиотреитолом.

При взаимодействии с оксидантами дитиотреитол за счет внутримолекулярной реакции может быстро превращаться в дитиан [27], как это показано на схеме, приведенной на рис. 3. В спектре поглощения дитиана имеется полоса с максимумом при 283 нм (рис. 1), пригодная для спектрофотометрического кинетического контроля реакций оксидантов с сульфгидрильной группой.

Для точного количественного описания кинетики взаимодействия исследуемых хлораминов с дитиотреитолом необходимо знать стехиометрический коэффициент этого процесса. Мы проводили измерения спектров поглощения при концентрациях хлораминовых оксидантов и дитиотреитола в смеси, не превышающих 1 мМ. При этом условии, как видно на рис. 4 и 5, при варьировании соотношения концентраций оксиданта и дитиотреитола получается система спектров поглощения с изобестической точкой, т.е. имеется длина волны, при которой молярные коэффициенты оксиданта и дитиана равны, оптическая плотность не изменяется в ходе реакции. Эти изобестические точки в случае N-хлор-2,2-диметилтаурина и N-хлорглицина находятся соответственно около 269 и 273,5 нм. Из этих данных следует, что в выбранных условиях взаимодействие хлораминов с дитиотреитолом осуществляется в молярном соотношении 1 : 1, т.е. убыль оксидантов и образование дитиана происходят в соответствии со схемой рис. 3. Возможное взаимодейст-

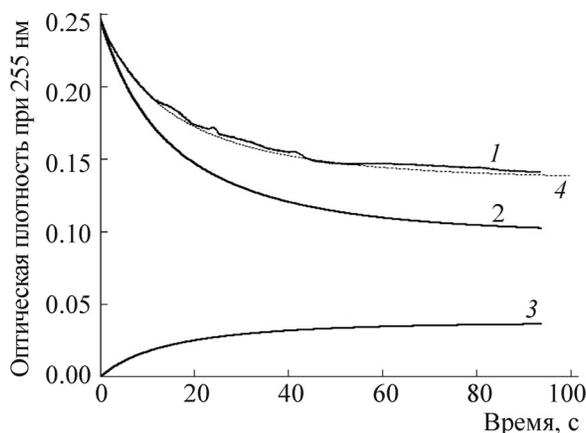


Рис. 6. Экспериментальная кинетическая кривая (1) оптической плотности смеси N-хлор-2,2-диметилтаурина (0,5 мМ) с дитиотрептолом (0,3 мМ), расчетные зависимости от времени оптической плотности отдельно N-хлор-2,2-диметилтаурина (кривая 2), дитиана (кривая 3) и сумма (штриховая линия 4) кривых 2 и 3. Константа скорости при расчетах – $150 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

вие оксидантов последовательно с двумя сульфгидрильными группами дитиотрептола, а также реакции промежуточных продуктов, имеющих активные группы атомов ($-\text{SCl}$) или ($-\text{SOH}$), с исходными молекулами дитиотрептола заметного вклада в его превращение не дают.

Полученные данные позволяют количественно описывать кинетику исследуемого процесса общеизвестным уравнением кинетики второго порядка. Конкретно, в нашем случае зависимости концентрации дитиана (C_{DT}) и концентрации оксиданта (C_{ox}) от времени имеют следующий вид:

$$C_{\text{DT}} = a(\exp(k(a-b)t) - 1) / ((a/b)\exp(k(a-b)t) - 1), \quad (1)$$

$$C_{\text{ox}} = a - C_{\text{DT}}.$$

В этой паре уравнений k – бимолекулярная константа скорости реакции, a и b – исходные концентрации соответственно оксиданта и дитиотрептола.

Следует подчеркнуть, что в водном растворе тиолов при физиологических значениях pH сульфгидрильные группы существуют и в ионизованной, и протонированной формах. Здесь и далее речь идет о формальной (наблюдаемой) константе, которую определяли в расчете на общую концентрацию реагирующих сульфгидрильных групп (из расчета одна активная группа в одной молекуле дитиотрептола). Оптические плотности, обусловленные отдельно дитианом и оксидантом, находим умножением этих уравнений на соответствующие молярные коэффициенты поглощения при рабочей длине

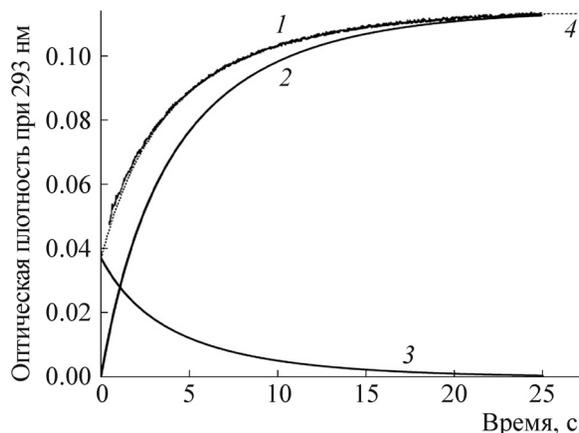


Рис. 7. Экспериментальная кинетическая кривая (1) оптической плотности смеси N-хлорглицина (0,5 мМ) с дитиотрептолом (1 мМ), расчетные зависимости от времени оптической плотности отдельно дитиана (кривая 2) N-хлорглицина (кривая 3), и сумма (штриховая линия 4) кривых 2 и 3. Константа скорости при расчетах – $270 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

волны. Важно подчеркнуть, что оптическая плотность исследуемого образца складывается из этих двух величин.

В эксперименте регистрировали кинетику оптической плотности реакционной смеси, получаемую путем быстрого введения в раствор оксиданта равный объем раствора дитиотрептола. Концентрации обоих соединений были подобраны так, чтобы реакция протекала десятки секунд. Это обеспечивало минимизацию неточности в отсчете начала реакции. Измерения повторяли не менее пяти раз с изменением начальной концентрации дитиотрептола. Длины волн также изменяли с расчетом зарегистрировать убыль оксиданта или, наоборот, образование продукта превращения дитиотрептола – дитиана. Примеры результатов таких измерений приведены на рис. 6 и 7.

Процедура определения бимолекулярной константы скорости состояла в следующем. При заданных исходных концентрациях рассчитывали, задавая определенное значение константы скорости, зависимости от времени оптической плотности оксиданта и дитиана, как это сказано выше. Их сумму сравнивали с экспериментальной зависимостью (рис. 6, 7). Эту процедуру повторяли с разными значениями константы, добиваясь наилучшего соответствия расчетной суммы и экспериментальной зависимости. Критерием этого соответствия была величина средней разницы за период примерно полупревращения. Она составляла менее 5–8%.

Полученные значения констант скоростей для оксидантов N-хлортаурина, N-хлор-2,2-ди-

Таблица 1. Константы скорости реакции между структурными аналогами N-хлортаурина и дитиотреитолом

Хлораминовое соединение	Константа скорости, $M^{-1}s^{-1}$		Заряд атома хлора по Малликену
	Дитиотреитол	Метионин	
N-хлортаурин	170 ± 4 ($220 \pm 11^*$)	–	0,0895
N-хлорглицин	$235 \pm 9,8$	–	0,0913
N-хлор-2,2-диметилтаурин	$145 \pm 4,3$	–	0,1001
N,N-дихлор-2,2-диметилтаурин	$12000 \pm 950^*$	$4,5 \pm 0,3$ (pH 5,25)	0,1734
N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурин	$25300 \pm 3000^*$	$11 \pm 0,9$ (pH 5,6)	0,1997

Примечание. * – Значения констант определены методом конкурентной кинетики.

метилтаурина и N-хлорглицина представлены в табл. 1. Интересно, что в этой группе оксидантов наблюдается не очень значительная разница изучаемых констант скоростей. Величина константы для N-хлортаурина сильно отличается от значения, приведенного в литературе [16]. Причина этого не вполне ясна.

Исследование взаимодействия высокорекционных хлораминовых оксидантов с сульфгидрильной группой дитиотреитола с помощью спектрофотометрии в сочетании с методом конкурентной кинетики. При физиологических значениях pH определить описанным прямым способом константы скоростей реакций между дитиотреитолом и структурными аналогами хлорамина таурина, имеющими N,N-дихлорную или N-хлорамидную группы атомов, не представляется возможным. Интересующие нас хлораминовые соединения N,N-дихлор-2,2-диметилтаурин, N,N-дихлортаурин и N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурин – настолько сильные оксиданты, что их реакции с дитиотреитолом

полностью завершались в период смешивания. Для определения констант скоростей быстрых реакций превращения тиолов широко используют метод конкурентной кинетики. Он заключается в том, что наблюдают ослабление превращения целевого тиола в присутствии другого соединения с известной константой скорости, конкурирующего за оксидант [16,30]. Измеряют остаток тиола или концентрацию продукта превращения после завершения реакции.

В нашем случае в качестве конкурирующего соединения удобен метионин. Он слабо поглощает ультрафиолетовый свет при длинах волн полосы поглощения дитиана (рис. 1), поэтому существенно не влияет на фотометрическое определение этого продукта превращения дитиотреитола. Известная формула конкурентной кинетики для изучаемой системы имеет следующий вид:

$$k/k_m = (\ln((b - C_{DT})/b)) / \ln((m_0 - (a - C_{DT}))/m_0). \quad (2)$$

В данной формуле k и k_m – константы скорости реакции оксиданта с дитиотреитолом и метионином, m_0 – исходная концентрация метионина. Остальные обозначения – как в уравнениях (1).

В эксперименте к смеси дитиотреитола и метионина добавляли равный по объему раствор оксиданта при энергичном перемешивании и через 1–2 мин измеряли спектр поглощения. Величину C_{DT} находили, измеряя оптическую плотность при 300 нм, чтобы исключить влияние остаточного метионина в случае его высоких концентраций. Для проверки применимости метода конкурентной кинетики к нашему объекту исследования вначале было проведено измерение константы скорости для N-хлортаурина при pH 7,4. Значение k_m было взято равным $39 M^{-1}s^{-1}$ согласно литературным данным [16], по нашим предварительным измерениям оно равно около $40 M^{-1}s^{-1}$. Результат расчета по уравнению (2) с использованием данных рис. 8 приведен в табл. 1. Полученная таким образом константа скорости довольно близка (отличие

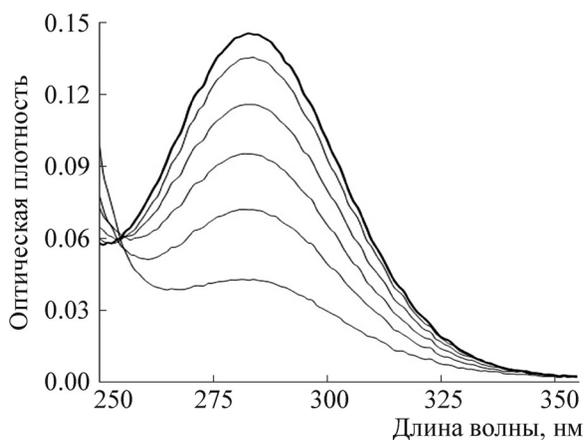


Рис. 8. Спектры поглощения дитиана, образовавшегося из дитиотреитола (0,75 мМ) в смеси с N-хлортаурином (0,55 мМ) (верхняя кривая) и в такой же смеси в присутствии метионина в концентрациях 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 15 мМ (кривые по порядку сверху вниз).

примерно на 30%) к величине, определяемой прямым методом.

Определить методом конкурентной кинетики константу скорости для высокоактивных хлораминовых соединений при физиологическом значении pH не удалось вследствие трудностей использования очень высоких концентраций метионина. Поэтому в опыте измеряли отношение k/k_m в кислой среде. Дело в том, что многие оксиданты, например перекись водорода, гипохлорит, хлорамины, преимущественно реагируют с заряженной формой ($-S^-$) сульфидрильной группы [33,34]. Ее pK_a находится в щелочном диапазоне, поэтому в кислой среде (pH 5–6) наблюдаемая константа скорости окисления тиолов резко уменьшается и к тому же константа для метионина несколько увеличивается. Следует отметить, что даже в этой ситуации измерить прямым спектрофотометрическим методом константу скорости для N,N-дихлорного оксиданта затруднительно вследствие того, что спектры поглощения дитиана и оксиданта сильно перекрываются (рис. 1).

Предварительно были определены константы скоростей реакции исследуемых хлораминовых оксидантов с метионином в кислой среде (табл. 1). Их измеряли в режиме реакций первого порядка, что обеспечивалось более чем двадцатикратным избытком метионина. При таком условии кинетическая кривая уменьшения оптической плотности оксиданта в полупологарифмических координатах представляла собой прямую (рис. 9). Ее угловой коэффициент равен произведению константы скорости и концентрации метионина.

Ожидаемая спектрофотометрическая картина образования дитиана в системе N,N-дихлорный оксидант, дитиотреитол и метионин требует специального пояснения. В реакциях этого оксиданта с дитиотреитолом и метионином одновременно образуются дитиан и N-моноклорный вариант оксиданта. Последний тоже взаимодействует с дитиотреитолом, но медленнее, и ослабление этого процесса метионином должно иметь место даже при его низких концентрациях. Поэтому уменьшение образования дитиана на 50% следует считать результатом торможения реакции, протекающей между дитиотреитолом и моноклорной формой оксиданта. Получается, что эффект конкурентного ослабления реакции между дихлорной формой оксиданта и дитиотреитолом – это уменьшение концентрации образующегося дитиана ниже уровня 50% при высоких концентрациях метионина.

Пример спектрофотометрических данных об образовании дитиана из дитиотреитола под действием N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурина

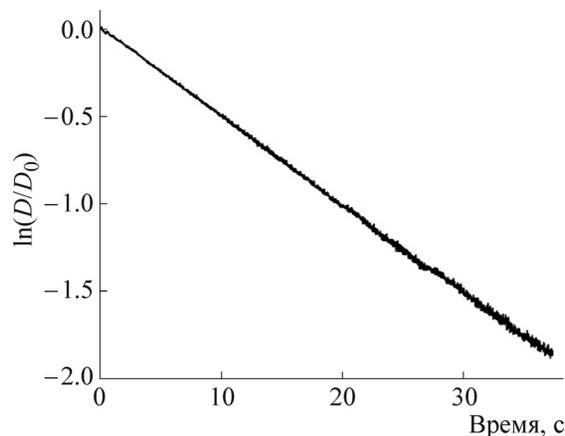


Рис. 9. Кинетика убыли N,N-дихлор-2,2-диметилтаурина (0,25 мМ) при взаимодействии с метионином (10 мМ) в режиме реакций первого порядка (pH 5,26). D_0 и D – оптическая плотность в начальный и текущий моменты.

на и N,N-дихлор-2,2-диметилтаурина при разных концентрациях метионина представлен на рис. 10. Такие данные мы использовали для расчетов отношений k_1/k_m по формуле (2). Найденные таким образом величины для N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурина и N,N-дихлор-2,2-диметилтаурина в кислой среде составили соответственно (407 ± 54) и $(94,5 \pm 9,4) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Эти величины необходимо пересчитать для физиологических условий. По уравнению Гендерсона–Хассельбаха находили концентрации заряженной формы сульфидрильной группы дитиотреитола ($pK_a = 9,2$ [31,32]) в кислой среде и pH 7,4. При переходе от значений pH 5,25 и 5,6 до 7,4 указанные концентрации увеличиваются соответственно в 124 и 62,13 раза. Путем умножения величин k_1 на эти числа были получены значения констант скоростей реакций при pH 7,4 (табл. 1).

Квантовомеханические характеристики реакционных свойств структурных аналогов хлорамина таурина. Среди расчетных молекулярных характеристик, отражающих реакционные свойства оксидантов, в первую очередь представляют интерес парциальные заряды атомов и длины связей в хлораминовой функциональной атомной группе. Были изучены четыре вида оксидантов, отличающихся по структуре функциональной группы: хлораминовая группа (1), алкилозамещенная хлораминовая группа (2), дихлораминовая группа (3) и хлорамидная группа (4). На рис. 11 видно, что эти варианты оксидантов сильно отличаются друг от друга величиной расчетного заряда активного хлора. Для оксидантов вида (2), получающихся при замещении атома водорода хлораминовой груп-

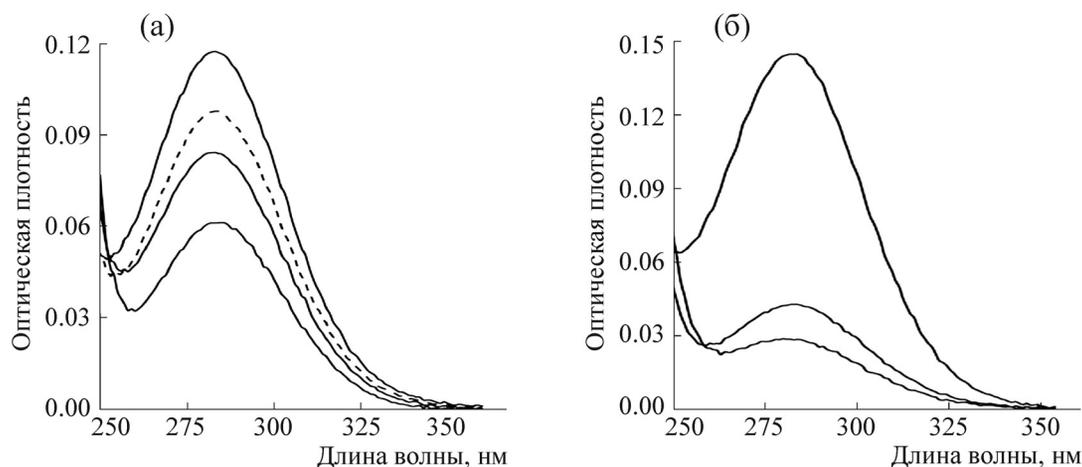


Рис. 10. Спектры поглощения дитиана, образующегося из дитиотреитола (0,75 мМ) в присутствии метионина в реакции с N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурином (рН 5,6) или N,N-дихлор-2,2-диметилтаурином (рН 5,25). (а) – Исходная концентрация N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурина 0,424 мМ, а концентрации метионина 0, 5, 10 и 20 мМ (кривые по порядку сверху вниз). (б) – Исходная концентрация N,N-дихлор-2,2-диметилтаурина 0,255 мМ (концентрация активного хлора 0,51 мМ), а концентрации метионина – 0, 10 и 20 мМ (кривые по порядку сверху вниз).

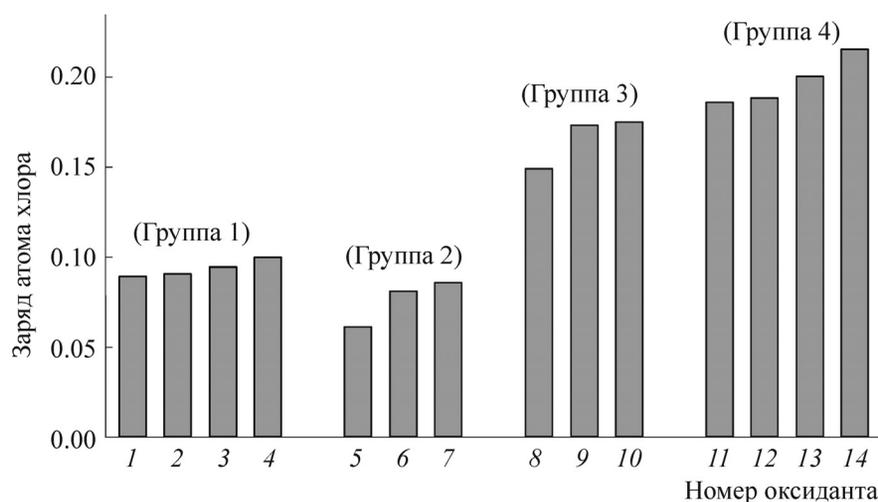


Рис. 11. Расчетные парциальные заряды активного хлора у разных оксидантов: столбики 1–4: N-хлортаурин, N-хлорглицин, N-хлорвалин, N-хлор-2,2-диметилтаурин; столбики 5–7: N-изопропил-N-хлортаурин, N-метил-N-хлорглицин, N-метил-N-хлортаурин; столбики 8–10: N,N-дихлорглицин, N,N-дихлор-2,2-диметилтаурин, N,N-дихлортурин; столбики 11–14: N-ацетил-N-хлортаурин, N-ацетил-N-хлорглицин, N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурин, N-хлорциклодиглицин (N-хлорпиперазин-2,5-дион).

пы на алкил, характерны наименьшие величины зарядов среди изученных соединений. В сравнении с оксидантами видов (1) и (2) величины зарядов активного хлора у оксидантов третьего вида, имеющих второй атом активного хлора (N,N-дихлорпроизводные), намного выше. Еще более высокие значения заряда активного хлора свойственны оксидантам вида (4) с N-хлорамидной функциональной группой, включая N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурин, который экспериментально изучен в настоящей работе.

Простое сопоставление рассмотренных расчетных данных и констант скоростей реакций между дитиотреитолом (табл. 1) и представителями оксидантов различных видов свидетельствует, что существует четкая связь реакционной способности хлораминовых оксидантов с величиной заряда активного хлора. Для более полного выяснения этого вопроса разыскивали множественную корреляционную зависимость, связывающую измеренные константы скоростей и молекулярные расчетные характеристики. Следует ожидать, что в число аргументов этой

Таблица 2. Расчетные константы скорости реакции между дитиотреитолом и структурными аналогами N-хлортаурина или N-хлорглицина

Соединение-оксидант	Расчетная константа скорости, $M^{-1}c^{-1}$	Реакционный центр
N-изопропил-N-хлортаурин	20 ($9,0 \pm 0,5$)*	N-алкилозамещенная хлораминовая группа
N-метил-N-хлорглицин (N-хлорсаркозин)	127	
N-метил-N-хлортаурин	102	
N,N-дихлорглицин	$4,4 \times 10^3$	N,N-дихлораминовая группа
N,N-дихлортурин	$11,9 \times 10^3$	
N-ацетил-N-хлортаурин	$20,2 \times 10^3$	N-хлорамидная группа
N-ацетил-N-хлорглицин	$34,5 \times 10^3$	
N-хлорциклодиглицин (N-хлорпиперазин-2,5-дион)	$17,3 \times 10^4$	N-хлорамидная группа
N-хлорсукцинимид	$60,3 \times 10^5$	N-хлоримидная группа

Примечание. * – Экспериментальное значение константы, полученное способом конкурентной кинетики.

зависимости может входить размер молекул оксидантов (молекулярная масса), поскольку при увеличении размеров реагирующих молекул усиливается влияние стерического ограничения. Было выявлено, что для пяти оксидантов (табл. 1) достаточно удовлетворительное уравнение (коэффициент множественной корреляции равен 0,9934) можно получить в виде зависимости величин констант от двух аргументов: парциальный заряд атома активного хлора и молекулярная масса. Уравнение имеет следующий вид:

$$k = \exp(1,46 + 55,61q - 0,0095M). \quad (3)$$

В этом уравнении k , q и M – численные значения соответственно константы скорости реакции, заряда атома хлора и молекулярной массы. Экспоненциальный характер зависимости был выбран исходя из того соображения, что молекулярные характеристики изменяются в небольших пределах, константы – на порядки.

При обратном расчете по уравнению (3) констант скоростей для указанных оксидантов получаются значения, отличающиеся от экспериментальных менее чем на 30%. Уравнение (3) позволяет в рамках такой точности предсказывать константы скорости для других оксидантов. Ожидаемые (расчетные) значения констант для N-изопропил-N-хлортаурина, N-метил-N-хлортаурина, N-метил-N-хлорглицина, N,N-дихлортурина, N,N-дихлорглицина, N-ацетил-N-хлортаурина, N-ацетил-N-хлорглицина, N-хлорпиперазин-2,5-диона, называемого также N-хлорциклодиглицином, и N-хлорсукцинимидом представлены в табл. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При исследовании модификации субстратов тиоловой и сульфидной природы получены обширные экспериментальные данные о реакционной способности хлорамина таурина и хлораминов ряда аминокислот [2,14,16,17,35]. Из этих данных следует, что константы скорости реакции данного хлорамина с различными тиолами, например, с глутатионом, цистеином, 3,3-диметилцистеином (пенициламином), цистеамином [15,16], хотя и различаются, но не в широких пределах. В настоящей работе в качестве модели биологически значимых тиолов был использован дитиотреитол (1,4-димеркаптобутан-2,3-диол), окисление которого хлораминами при умеренных концентрациях протекало в стехиометрическом соотношении 1 : 1. Это позволило осуществить строгое описание кинетики изучаемого процесса уравнением реакции второго порядка и тем самым обеспечивало определение константы скорости по экспериментальным данным кинетики оптической плотности. В наших опытах константа скорости реакции окисления сульфгидрильной группы дитиотреитола под действием N-хлортаурина (табл. 1) отличалась от константы для восстановленного глутатиона только примерно на 70% и попадает в диапазон констант, характерных для других биологически значимых тиолов.

Важно отметить, что реакции с глутатионом и цистеином различных монохлораминов – N-хлортаурина, N-хлорглицина и N(эпсилон)-хлор-N-ацетиллизина – протекают со сравнимыми скоростями [16]. Наши данные согласуются с этой закономерностью: реакции различных монохлораминов с дитиотреитолом харак-

теризуются близкими константами скоростей (табл. 1). Это указывает на то, что реакционная способность хлораминовых соединений в отношении тиолов не сильно зависит от атомных групп, расположенных в молекулах далеко от реакционного центра с активным хлором.

В литературе имеются оценочные данные о реакционной активности оксидантов, свойства которых определяет не просто хлораминовая группа в первичном амине, а иные функциональные группы. Например, указано, что константа скорости реакции между N,N-дихлортаурином и восстановленным глутатионом превышает $1000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [21], а N-хлорциклодиглицин окисляет восстановленный глутатион (рН 7,2) с константой скорости, превышающей $50000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [36]. В настоящей работе применен метод конкурентной кинетики с использованием метионина в качестве конкурирующего субстрата, чтобы определить константы скорости для N,N-дихлор-2,2-диметилтаурина (представитель N,N-дихлорного реакционного центра) и N-ацетил-N-хлор-2,2-диметилтаурина (пример N-хлорамидного реакционного центра). Измерения удалось провести благодаря первоначальному определению скорости превращения дитиотреитола под действием оксидантов в кислой среде, когда процесс сильно замедлен, и последующему пересчету константы скорости на концентрацию заряженной формы сульфгидрильной группы при физиологических условиях. Обобщая экспериментальные данные, полученные для N-хлортаурина и его структурных аналогов (табл. 1), можно заключить, что реакционная активность монохлораминового оксиданта почти на два порядка ниже активности оксиданта, имеющего N,N-дихлорный реакционный центр. Однако реакционная активность этого оксиданта значительно уступает активности N-хлорамидного оксиданта. Самую низкую способность окислять сульфгидрильную группу имеет оксидант, имеющий реакционный центр в виде алкилозамещенной хлораминовой группы, как это видно на примере N-изопропил-N-хлортаурина (табл. 2).

Возникает вопрос, справедлива ли эта закономерность и для других соединений с активным хлором. Для изучения этой проблемы мы привлекли квантово-механические расчеты молекулярных характеристик оксидантов. Обнаружено, что указанные выше оксиданты с различными реакционными центрами характеризуются разными значениями парциального заряда активного хлора (рис. 11). Значения констант скоростей реакции с дитиотреитолом, определенные экспериментально, отчетливо коррелируют с величинами парциального заряда

активного хлора (табл. 1). Все это позволило количественно связать константы и заряды атома хлора в виде уравнения множественной корреляции, в котором кроме заряда активного хлора аргументом служит молекулярная масса оксиданта. Результаты расчета по этому уравнению констант скоростей для ряда других оксидантов свидетельствуют (табл. 2), что среди хлораминовых оксидантов, являющихся структурными аналогами хлораминов аминокислот и таурина, наблюдается описанная выше общая закономерность, касающаяся структуры реакционных центров и способности окислять тиолы. Следует отметить, что замещение атомов водорода в положении 2 на метильные группы в структурных аналогах хлорамина таурина, если и влияет на их реакционную способность, то слабо (табл. 1 и табл. 2).

Интересно сравнить способности обсуждаемых оксидантов окислять сульфгидрильную и сульфидную группы атомов. Как и в случае тиолов, реакции между метионином и хлораминами различных аминокислот и таурина отличаются по величине констант скоростей лишь в несколько раз [15–17]. Константы скорости окисления метионина оксидантами с алкилозамещенной хлораминовой группой того же порядка, что и в случае хлорамина таурина, достигают $10\text{--}15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [17]. Расчеты предсказывают [17], что реакция между метионином и оксидантами с хлорамидным реакционным центром должна протекать медленнее, чем в случае хлорамина таурина.

Исходя из рассмотренных данных, можно выявить структурные особенности хлораминовых оксидантов, которые обеспечивают в сложных биологических объектах избирательность начальной модификации белковой мишени, содержащей чувствительный (доступный) остаток свободного цистеина (I), или мишени с чувствительным остатком метионина (II). Выбрав показатель избирательности, по уравнению (2) можно найти отношение констант скоростей реакций с мишенями I и II, обеспечивающее избирательность. Возьмем в качестве показателя избирательности долю оксиданта, прореагировавшего с мишенью данного типа. Если этот показатель равен 0,95, будем считать, что имеет место выраженная избирательность. При этом условии и при одинаковой концентрации обеих мишеней в исследуемом объекте расчет показывает, чтобы выраженная избирательность взаимодействия была на стороне мишени I, константа скорости реакции оксиданта с ее сульфгидрильной группой должна превышать константу для сульфидной группы в мишени II примерно в 50 раз. Монохлораминовые произ-

водные таурина и аминокислот должны модифицировать оба типа обсуждаемых мишеней без выраженной избирательности: константы скорости реакций сульфгидрильной и сульфидной групп с оксидантами отличаются недостаточно. Структурные аналоги хлорамина таурина, в которых реакционный центр – алкилозамещенная хлораминовая группа, сравнительно медленно взаимодействуют с сульфгидрильной группой (табл. 2). Несмотря на это, такие оксиданты не способны с высокой избирательностью модифицировать мишень, в которой чувствительным центром является метионин. Оксидантами высокоизбирательного типа действия на молекулярную мишень с чувствительным остатком цистеина должны быть хлораминовые производные таурина и аминокислот, у которых реакционный центр – N,N-дихлорная или N-хлорамидная группы атомов. N-хлорамидные оксиданты, как имеющие один атом активного хлора, удобны для избирательного ковалентного ингибирования функций белков-тиолов в тех или иных целях.

Итак, все рассмотренные данные свидетельствуют о том, что реакционная способность структурных аналогов хлораминов таурина и аминокислот варьирует в очень широких пределах: разница в величинах констант скоростей окисления сульфгидрильной группы дитиотрептола составляет несколько порядков. Это определяется различием в структуре реакционных центров оксидантов. Наибольшей реакционной способностью обладают хлораминовые оксиданты, в которых реакционный центр представляет собой N-хлорамидную структуру. Такие оксиданты могут обеспечить высоко избирательную ковалентную модификацию белков-тиолов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00220).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. M. Zgliczynski, T. Stelmazyńska, J. Domanski, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 419 (1971).
2. E. L. Thomas, M. B. Grisham, and M. M. Jefferson, *J. Clin. Invest.* **72**, 441 (1983).
3. C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, and M. B. Hampton, *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 765 (2016).
4. M. A. Murina, D. I. Roshchupkin, N. N. Kravchenko, et al., *Biophysics* **42** (6), 1311 (1997).
5. T. W. Stief, J. Kurz, M. O. Doss, et al., *Thromb. Res.* **97**, 473 (2000).
6. T. W. Stief, U. Feek, A. Ramaswamy, et al., *Thromb. Res.* **104**, 361 (2001).
7. M. A. Murina, O. D. Fesenko, V. I. Sergienko, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **134** (1), 36 (2002).
8. C. Martini, A. Hammer-Lrecher, M. Zuck, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **56** (4), 1979 (2012).
9. J. Mustedanagic, V. F. Ximenes, and M. Nagl, *AMB Expr.* **7**, 102 (2017).
10. M. Gruber, I. Moser, M. Nagl, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **61** (5), e02527-16 (2017). DOI: 10.1128/AAC.02527-16 (2017).
11. S. A. Rani, C. Celeri, R. Najafi, et al., *Urolithiasis* **44** (3), 247 (2016).
12. W. Gottardi, M. Hagleitner, and M. Nagl, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **338** (10), 473 (2005).
13. L. Wang, B. Belisle, M. Bassiri, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **55** (6), 2688 (2011).
14. A. C. Carr, C. L. Hawkins, S. R. Thomas, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **30** (5), 526 (2001).
15. C. L. Hawkins, D. I. Pattison, and M. J. Davies, *Amino Acids* **25**, 259 (2003).
16. A. V. Peskin and C. C. Winterbourn, *Free Radic. Biol. Med.* **30** (5), 572 (2001).
17. D. I. Roshchupkin, K. V. Kondrashova, and M. A. Murina, *Biophysics* **59** (6), 849 (2014).
18. W. Vogt, *Free Radic. Biol. Med.* **18** (1), 93 (1995).
19. W. Gottardi and M. Nagl, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **9**, 411 (2002).
20. L. Wang, B. Khosrovi, and R. Najafi, *Tetrahedron Lett.* **49**, 2193 (2008).
21. M. A. Murina, D. I. Roshchupkin, N. A. Chudina, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **147** (6), 704 (2009).
22. D. I. Roshchupkin, M. A. Murina, and V. I. Sergienko, *Biophysics* **56** (5), 945 (2011).
23. D. I. Roshchupkin, M. A. Murina, N. N. Kravchenko, et al., *Biofizika* **52** (3), 527 (2007).
24. M. A. Murina, D. I. Roshchupkin, K. V. Kondrashova, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **157** (2), 207 (2014).
25. D. I. Roshchupkin, K. V. Buravleva, M. A. Murina, et al., *Biophysics* **62** (1), 24 (2017).
26. D. Braghiroli and M. D. Bella, *Tetrahedron Lett.* **37**, 7319 (1996).
27. K. S. Iyer and W. A. Klee, *J. Biol. Chem.* **248** (2), 707 (1973).
28. R. A. Johnson and F. D. Greene, *J. Org. Chem.* **40** (15), 2186 (1975).
29. P. Nagy and M. T. Ashby, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (45), 14082 (2007).
30. C. Storkey, M. J. Davies, and D. I. Pattison, *Free Radic. Biol. Med.* **73**, 60 (2014).
31. D. Luo, S. W. Smith, and B. D. Anderson, *J. Pharm. Sci.* **94** (2), 304 (2005).
32. C. C. Winterbourn and D. Metodiewa, *Free Radic. Biol. Med.* **27** (3/4), 322 (1999).
33. H. Fukada and K. Takahashi, *J. Biochem.* **87** (4), 1105 (1980).
34. M.-H. Chau and J. W. Nelson, *FEBS Lett.* **291** (2), 296 (1991).

35. L. Carroll, D. I. Pattison, S. Fud, et al., *Redox Biol.* **12**, 872 (2017). 36. W. A. Prutz, *Arch. Biochem. Biophys.* **371** (1), 107 (1999).

Properties of Biologically Significant Chloramine Oxidants: Reactivity and Its Dependence on the Structure of the Functional Atom Group

D.I. Roshchupkin* **, V.L. Sorokin***, G.N. Semenkova***,
K.V. Buravleva**, and M.A. Murina**

**Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

***Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of Russian Federation, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia*

****Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Republic of Belarus*

A procedure for the direct photometric determination of rate constants for the oxidation of dithiothreitol (a thiol-compound example) by N-chlorotaurine and N-chloroglycine and their analogues that have a different structure of the reaction center was developed. The time dependences of the sum of the chloramine oxidant absorbance and the absorbance of dithian (the product of the dithiothreitol conversion) were calculated for different values of the bimolecular rate constant. The rate constant value was considered as established when the best agreement between the calculated curve and the measured kinetic curve of absorbance was observed. Oxidative activities of monochloramine oxidants differed little: the rate constants for N-chlorotaurine, N-chloroglycine and N-chloro-2,2-dimethyltaurine were equal to 170 ± 4 , 235 ± 9.8 and $145 \pm 4.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. When reaction center structure was modified by introducing the substituents of the hydrogen atom into chloramine group, activities of the compounds under study changed dramatically: the rate constants for N-isopropyl-N-chlorotaurine, N,N-dichloro-2,2-dimethyltaurine and N-acetyl-N-chloro-2,2-dimethyltaurine, determined with a competitive kinetics method, were 9 ± 0.5 , 12000 ± 950 and $25300 \pm 3000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. The reactivity of N-chloroglycine and the structural analogues of taurine chloramine with respect to thiol-compounds correlates with the magnitude of active chlorine charge. Predictions about reactivity of unknown structural analogues of N-chloramino acids and N-chlorotaurine were obtained.

Keywords: oxidant, N-chlorotaurine, N-acetyl-N-chloro-2,2-dimethyltaurine, dithiothreitol, spectrophotometry, rate constant