ХИМИЯ ВЫСОКИХ ЭНЕРГИЙ, 2019, том 53, № 6, с. 478–483

РАДИАЦИОННАЯ ХИМИЯ

УДК 544.54:547.752

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ТРИПТОФАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ОКСИГЕНИРОВАННОМ ЭТАНОЛЕ

© 2019 г. С. Д. Бринкевич[a], Д. А. Кузьмук[a], Р. Л. Свердлов[a], О. И. Шадыро[a, *]

[a] *Белорусский государственный университет, просп. Независимости, 4, Минск, 220030 Беларусь*

*****E-mail: shadyro@tut.by*

Поступила в редакцию 10.05.2019 г.
После доработки 07.06.2019 г.
Принята к публикации 18.06.2019 г.

Методом стационарного радиолиза исследовано взаимодействие триптофана, триптамина и 3-индолпропионовой кислоты с пероксильными радикалами, образующимися при радиолизе насыщенного кислородом этанола. Установлено, что 3-индолпропионовая кислота обладает низкой реакционной способностью по отношению к пероксильным радикалам. В то время как триптамин и, в меньшей степени, триптофан ингибируют радиационно-индуцированные процессы окисления этанола за счет переноса электрона с неподеленной пары аминогруппы на кислородцентрированные радикалы. Образующиеся в этих реакциях катион-радикалы триптофана и триптамина преимущественно регенерируются до исходных соединений при взаимодействии с $O_2^{\bullet-}$ и $HO_2^{\bullet}$, о чем свидетельствуют невысокие радиационно-химические выходы разложения тестируемых соединений.

Ключевые слова: стационарный радиолиз, триптофан, триптамин, 3-индолпропионовая кислота, этанол, кислородцентрированные радикалы

DOI: 10.1134/S0023119319060020

ВВЕДЕНИЕ

Триптамин, серотонин, мелатонин, мексамин и др. производные триптофана обладают выраженными радиопротекторными, антиоксидантными, нейропротекторными свойствами [1]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе их физиологической активности, являются предметом интенсивного изучения. Известно, что за формирование радиопротекторных свойств могут быть ответственны сосудосуживающие свойства производных триптофана, что приводит к снижению парциального давления кислорода в тканях [2]. Кроме того, они способны подавлять радиационно-индуцированные повреждения в биологических системах за счет эффективного взаимодействия с радикальными продуктами радиолиза воды [3]. Однако при соотношении максимально переносимых концентраций производных триптофана к усредненным концентрациям органических соединений в клетках становится очевидным, что индолсодержащие соединения в организме экспериментальных животных не способны выиграть конкуренцию за радикальные продукты радиолиза воды. В этих условиях их радиопротекторные и антиоксидантные свойства могут быть обусловлены взаимодействием с углерод- и кислородцентрированными радикалами биогенных органических соединений.

Ранее мы показали [4], что синтезируемые *in vivo* производные триптофана эффективно ингибируют процессы с участием углеродцентрированных радикалов. При этом триптофан, 5-гидрокситриптофан, серотонин и в меньшей степени мелатонин способны присоединять α-гидроксиэтильные радикалы (**α-ГЭР**) по индольному фрагменту, в то время как β-карболиновые алкалоиды подавляют рекомбинацию α-ГЭР за счет их окисления. Отдельные производные триптофана также эффективно подавляют процессы с участием кислородцентрированных радикалов, причем активность может быть связана как с наличием фенольного гидроксила [5], так и с незамещенной аминогруппой [6].

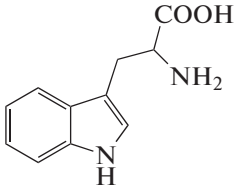
В то же время в литературе описаны [7, 8] выраженные антиоксидантные свойства 3-индолпропионовой кислоты, которая не имеет ни одного из этих функциональных фрагментов. В работах [9, 10] показаны перспективы использования 3-индолпропионовой кислоты для профилактики нейродегенеративных заболеваний и сахарного диабета второго типа, в развитии которых важную роль играют свободнорадикальные реак-

ции. Это обусловливает необходимость исследования механизма взаимодействия 3-индолпропионовой кислоты с кислородцентрированными радикалами.

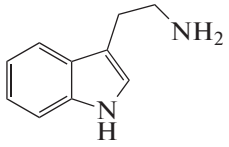
В настоящей работе методом стационарного радиолиза изучено взаимодействие триптофана, триптамина и 3-индолпропионовой кислоты с пероксильными радикалами, образующимися при радиолизе этанола, насыщенного кислородом.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

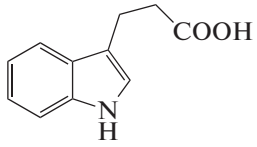
Без предварительной очистки использовали триптофан (I), триптамин (II) и 3-индолпропионовую кислоту (III), гидроксид натрия фирмы “Sigma-Aldrich”, $TiOSO_4 \cdot 2H_2O$ “Вектон”, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, иодид калия, гидрофталат калия “Беллесхимкомплект”. Чистота использованных соединений составляла не менее 98%. Спирт этиловый пищевой марки “Люкс” (96 об. %) перед использованием очищали перегонкой на ректификационной колонне.



Триптофан (I)



Триптамин (II)



3-Индолпропионовая кислота (III)

Для приготовления оксигенированных растворов тестируемых соединений в этаноле с концентрацией 5×10^{-4} моль/л использовали следующую методику. В силу высокой летучести растворителя растворы продували кислородом высокой степени чистоты (99.999%) в мерных колбах в течение 60 мин, после чего объем испарившегося растворителя компенсировали оксигенированным этанолом, далее растворы перемешивали. Предварительно продутые кислородом пенициллиновые флаконы заполняли растворами и закрывали пластиковыми крышками. По нашим наблюдениям использование флаконов для радиационно-химических превращений органических веществ, насыщенных кислородом, имеет ряд преимуществ перед ампулами. В частности, концентрация O_2 в растворе в меньшей степени изменяется по ходу облучения, кроме того исключаются артефакты, связанные с выгоранием (иногда с детонацией) кислорода при запайке ампул.

Облучение образцов проводили на установке МРХ-γ-25М с источником ^{60}Co. Мощность поглощенной дозы составляла 0.113 ± 0.007 Гр/с. Интервал поглощенных доз 0.07–0.38 кГр.

Концентрацию пероксида водорода определяли реагентнофотометрическим методом аналогично [11]. Детектирование желтого комплекса пероксида водорода с сульфатом титанила в сернокислом растворе выполняли при $\lambda_{max} = 405$ нм на Specord S600 (Analytik Jena, Германия). Суммарную концентрацию органических и неорганических пероксидов определяли реагентнофотометрическим методом, основанным на молибдат-активированном окислении иодида [12]. Предварительно готовили раствор, содержащий 0.2 г NaOH, 0.02 г $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 6.6 г KI в 100 мл дистиллированной воды, а также 2% водный раствор гидрофталата калия. Непосредственно перед анализом пероксидов растворы смешивали в соотношении 1 : 1 для приготовления аналитического реагента. Для количественного определения суммы пероксидов к 1.2 мл исследуемой пробы добавляли 2 мл реагента и 4 мл дистиллированной воды. Оптическую плотность измеряли на Specord S600 при длине волны максимума поглощения трииодид-аниона – 350 нм.

Количественный анализ соединений (I), (II) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе “Shimadzu” (Япония) с использованием детектора на диодной матрице SPD-M20A при длине волны 281 нм. Условия хроматографирования: колонка Shim-pack VP-ODS (длина – 150 мм, внутренний диаметр – 4.6 мм, размер зерен – 4.6 мкм); элюент – метанол/вода (10/90); скорость подачи элюента 0.4 мл/мин; температура 25°C; объем вводимой пробы – 1 мкл, 3-индолпропионовую кислоту (III) анализировали спектрофотометрическим методом на Specord S600 при длине волны 281 нм.

Концентрацию ацетальдегида (АА) определяли аналогично [13] на газовом хроматографе GC-17A фирмы “Shimadzu” с кварцевой капиллярной колонкой SupelcoWAX (длина 30 м, внутренний диаметр – 0.25 мм, толщина пленки неподвижной фазы – 0.5 мкм). Качественный и количественный анализ проводили с помощью внешнего стандарта. Условия анализа: начальная температура – 40°C, с градиентом 5°C/мин подъем температуры до 80°C и затем с градиентом 15°C/мин – до 180°C; температура инжектора – 240°C; тем-

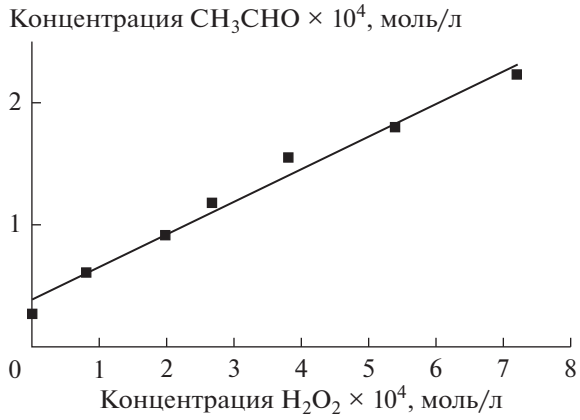


Рис. 1. Образование ацетальдегида при термическом разложении пероксида водорода в инжекторе хроматографа.

пература детектора – 220°C; линейная скорость потока в колонке – 20 см/с; газ-носитель – азот; детектор – пламенно-ионизационный; объем задаваемой пробы – 1 мкл.

Для улучшения коэффициента разделения легколетучих продуктов радиационно-индуцированных превращений насыщенного кислородом этанола использовали относительно высокую температуру инжектора, что приводило к термическому разложению пероксида водорода, содержащегося в исследуемых образцах. Зависимость регистрируемой концентрации ацетальдегида от содержания пероксида водорода в необлученном этаноле была линейная в используемом диапазоне концентраций H_2O_2 (рис. 1). Приведенные в работе значения радиационно-химического выхода ацетальдегида указаны за вычетом количеств, образующихся при термическом разложении.

Для получения величин радиационно-химических выходов использовали результаты не менее трех независимых экспериментов. Значение ошибки определения радиационно-химических выходов рассчитывали в программе Origin 8.1 Pro методом наименьших квадратов с использованием коэффициента доверительной вероятности 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Радиационно-химические превращения этанола, насыщенного кислородом, детально исследованы [14], что делает его удобной и доступной моделью для изучения реакций кислородцентрированных радикалов с тестируемыми веществами. Основным радикальным продуктом радиолиза деаэрированного этанола является α-ГЭР, образующийся с радиационно-химическим выходом ~5.5 частиц/100 эВ в результате реализации ион-молекулярной реакции (4), радикал-молекулярных процессов (7) и непосредственно при распаде возбужденной молекулы спирта (5):

$$CH_3CH_2OH \rightsquigarrow CH_3CH_2OH^* \quad (1)$$

$$CH_3CH_2OH \rightsquigarrow CH_3CH_2OH^{\oplus\cdot} + e^{\ominus} \quad (2)$$

$$e^{\ominus} \longrightarrow e^{\ominus}_{(therm)} \longrightarrow e^{\ominus}_{(solv)} \quad (3)$$

$$CH_3CH_2OH^{\oplus\cdot} + CH_3CH_2OH \longrightarrow CH_3CH_2OH_2^{\oplus} + CH_3\dot{C}HOH \quad (4)$$

$$CH_3CH_2OH^* \longrightarrow CH_3\dot{C}HOH + H^{\cdot} \quad (5)$$

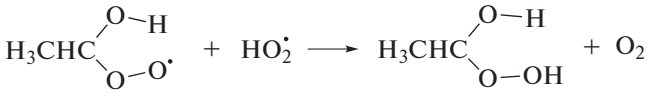
$$CH_3CH_2OH^* \longrightarrow CH_3\dot{C}H_2 + \dot{O}H\ (CH_3CH_2O^{\cdot} + H^{\cdot}) \quad (6)$$

$$CH_3CH_2OH + CH_3CH_2\dot{O}\ (CH_3\dot{C}H_2,\ \dot{O}H,\ \dot{H}) \longrightarrow CH_3\dot{C}HOH + CH_3CH_2OH\ (CH_3CH_3,\ H_2O,\ H_2) \quad (7)$$

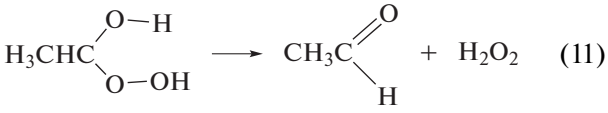
Как и большинство других углеродцентрированных радикалов α-ГЭР с константой скорости реакции 4.6×10^9 л моль$^{-1}$ с$^{-1}$ [15] присоединяют молекулярный кислород с образованием α-гидроксиэтилпероксильных радикалов по реакции (8). Дальнейшие превращения этих частиц включают фрагментацию с элиминированием гидропероксильных радикалов (реакция (9)) или восстановление до соответствующего органического гидропероксида по реакции (10).

$$CH_3\dot{C}HOH \xrightarrow{O_2} H_3C{-}HC(O{-}H)(O{-}O^{\cdot}) \quad (8)$$

$$H_3C{-}HC(O{-}H)(O{-}O^{\cdot}) \longrightarrow CH_3C(=O)H + HO_2^{\cdot} \quad (9)$$



(10)

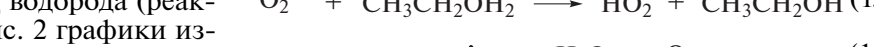


(11)

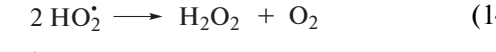
В этаноле α-гидроксиэтилпероксид распадается на ацетальдегид и пероксид водорода (реакция (11)). Представленные на рис. 2 графики изменения концентрации H_2O_2 (титанильный метод анализа) и суммы пероксидов (иодный метод) от дозы при облучении насыщенного кислородом этанола без добавок и в присутствии триптамина различаются менее чем на 5%. Таким образом, органические пероксиды не детектируются в качестве конечных молекулярных продуктов радиолиза насыщенного кислородом этанола.

Насыщение этанола кислородом также приводит к исключению сольватированного электрона из состава радикальных продуктов радиолиза вследствие реализации реакции (12) с константой скорости реакции 2×10^{10} л моль$^{-1}$ с$^{-1}$ [3]. Конечным молекулярным продуктом превращения $O_2^{\cdot-}$ и $HO_2^{\cdot}$ является пероксид водорода.

(12)



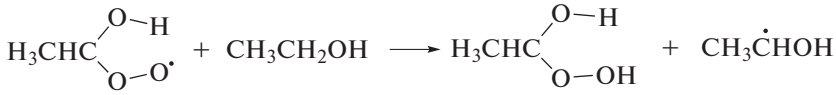
(13)



(14)

Таким образом, основными продуктами радиационно-индуцированных превращений этанола, насыщенного кислородом, являются ацетальдегид и пероксид водорода.

Радиационно-химические выходы ацетальдегида и пероксида водорода, наблюдаемые при радиолизе оксигенированного этанола в отсутствие добавок (табл. 1) превышают первичный выход α-ГЭР более чем в 2 раза. Это свидетельствует о том, что окисление этанола происходит по короткоцепному механизму вследствие протекания следующих реакций:



(15)

(16)

Поскольку концентрации исследуемых веществ (I–III) в растворе составляли 5×10^{-4} моль/л, реакциями исследуемых соединений с $H^{\cdot}$, алкильными, гидроксиалкильными и алкоксильными радикалами, образующимися при радиолизе этанола, можно пренебречь. Соответственно, наблюдаемые изменения радиационно-химических выходов основных продуктов радиолиза насыщенного кислородом этанола (табл. 1) в присутствии соединений (I–III) связаны с их способностью взаимодействовать с пероксильными радикалами, образующимися в реакциях 8, 9, 12, 13.

При облучении насыщенного кислородом этанола в присутствии триптофана (I) и триптамина (II) происходит снижение радиационно-химических выходов основных молекулярных продуктов радиолиза, что свидетельствует о способности тестируемых веществ регулировать процессы с участием кислородцентрированных радикалов. При этом в случае 3-индолпропионовой кислоты (III), не имеющей аминогруппы в отличие от соединений (I) и (II), снижение радиационно-химических выходов ацетальдегида и пероксида водорода по сравнению с системой без добавок не превышает величины погрешности измерения этих величин. Следовательно, за взаимодействие с пероксильными радикалами ответственна именно аминогруппа триптофана (I) и триптамина (II), а не индольный фрагмент в структуре тестируемых веществ.

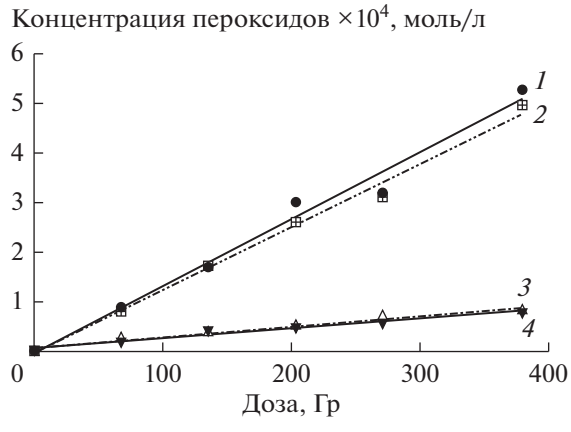
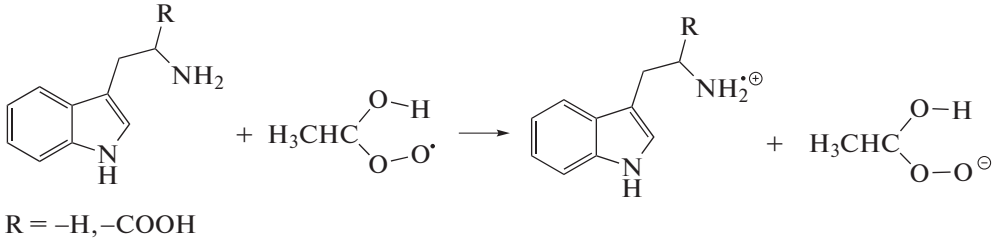


Рис. 2. Зависимости концентрации пероксидов, измеренных иодным (*1*, *4*) и титанильным (*2*, *3*) методами, от поглощенной дозы при облучении этанола без добавок (*1*, *2*) и в присутствии триптамина (*3*, *4*).

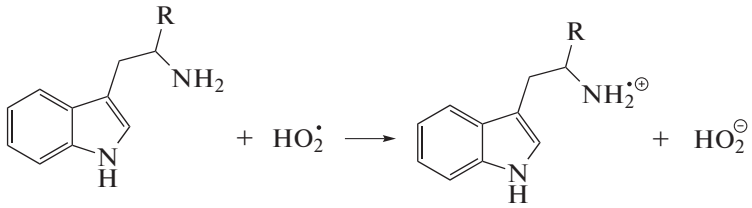
Таблица 1. Влияние триптофана и его производных на радиационно-индуцированные превращения насыщенного кислородом этанола

Тестируемое соединение	Радиационно-химический выход (G), молекула/100 эВ		
	Ацетальдегид	H_2O_2	Разложение добавки
Без добавок	16.18 ± 1.09	14.23 ± 1.37	–
Триптофан (I)	11.48 ± 0.73	9.53 ± 0.51	–0.46 ± 0.09
Триптамин (II)	8.85 ± 0.60	3.01 ± 0.41	–1.22 ± 0.12
3-Индолпропионовая кислота (III)	14.90 ± 1.28	12.72 ± 0.70	–0.16 ± 0.15

Ранее было показано, что депротонированная аминогруппа может выступать донором электрона в реакциях аминокислот с различными кислородцентрированными радикалами [4, 16, 17]. Взаимодействие триптофана (I) и триптамина (II) с пероксильными радикалами может происходить по следующим реакциям:



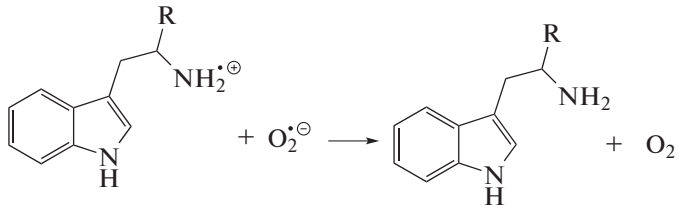
R = –H, –COOH (17)



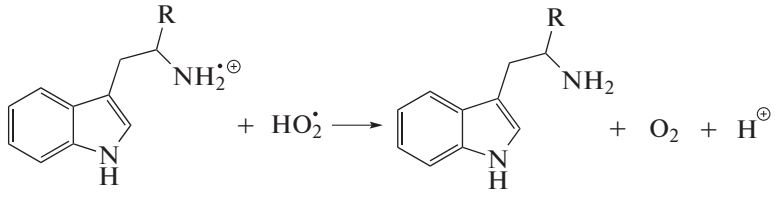
R = –H, –COOH (18)

Восстановление пероксильных радикалов по реакциям (17)–(18) приводит к терминации короткоцепного процесса окисления этанола, что и обуславливает снижение выходов основных продуктов радиолиза оксигенированного этанола в присутствии триптофана (I) и триптамина (II). Различия в реакционной способности рассматриваемых соединений могут быть связаны с тем, что триптофан (I) в этаноле частично находится в цвиттер-ионной форме, и протонированная аминогруппа не способна восстанавливать пероксильные радикалы.

Невысокие радиационно-химические выходы разложения триптофана (I) и триптамина (II) при радиолизе в оксигенированном этаноле указывают на способность катион-радикалов, образующихся в реакциях (17)–(18), восстанавливаться до исходных соединений. К регенерации триптофана (I) и триптамина (II) могут приводить реакции их катион-радикалов с супероксид анион-радикалами и гидропероксильными радикалами:



(19)



(20)

R = –H, –COOH

Представленные в работе результаты могут свидетельствовать о том, что радиопротекторные, антиоксидантные, антигипоксантные свойства триптамина (II), наблюдаемые *in vivo*, могут быть связаны с его способностью эффективно подавлять процессы с участием кислородцентрированных радикалов пероксильного типа. В то же время 3-индолпропионовая кислота (III) обладает низкой реакционной способностью по отношению к пероксильным радикалам, поэтому ее антиоксидантные и нейропротекторные свойства могут быть связаны или с акцептированием $\bullet OH$ ($k = 7.8 \times 10^{10}$ л моль$^{-1}$ с$^{-1}$ [7]), или с присоединением углеродцентрированных радикалов по индольному фрагменту.

ВЫВОДЫ

Сопоставление полученных в работе данных свидетельствует о том, что триптамин (II) и, в меньшей степени, триптофан (I) ингибируют радиационно-индуцированные процессы окисления этанола, что связано с наличием у этих соединений непротонированной аминогруппы. Значения радиационно-химических выходов продуктов радиолиза насыщенного кислородом этанола в присутствии 3-индолпропионовой кислоты (III) лишь в пределах ошибки эксперимента ниже по сравнению с системой без добавок. Таким образом, антиоксидантные и радиопротекторные свойства триптофана (I) и триптамина (II) могут быть обусловлены способностью этих соединений восстанавливать кислородцентрированные радикалы за счет переноса электрона с неподеленной пары аминогруппы. Образующиеся в этой реакции катион-радикалы преимущественно восстанавливаются до исходных соединений, о чем свидетельствуют невысокие радиационно-химические выходы разложения исследуемых веществ. К регенерации триптофана (I) и триптамина (II) могут приводить реакции их катион-радикалов с супероксид анион-радикалами и гидропероксильными радикалами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free radicals in biology and medicine. Oxford: University press, 1999.
2. *Straube R.L., Patt H.M.* // Annu. Rev. Pharmacol. 1963. V. 3. P. 293.
3. *Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B.* // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1988. V. 17. № 2. P. 513.
4. *Sverdlov R.L., Brinkevich S.D., Shadyro O.I.* // Free radical research. 2014. V. 48. № 10. P. 1200.
5. *Galano A., Castaneda-Arriada R., Perez-Gonzalez A., Tan D.-X., Reiter R.J.* // Molecules. 2016. V. 21. № 11. P. 1442.
6. *Свердлов Р.Л., Хрищанович А.В., Бринкевич С.Д., Шадыро О.И.* // Химия высоких энергий. 2015. Т. 49. № 2. С. 89.
7. *Poeggeler B., Pappolla M.A., Hardeland R., Rassoulpour A., Hodgkins P.S., Guidetti P., Schwarcz R.* // Brain Res. 1999. V. 815. № 2. P. 382.
8. *Chyan Y.-J., Poeggeler B., Omar R.A., Chain D.G., Frangione B., Ghiso J., Pappolla M.A.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 31. P. 21937.
9. *De Mello V.D., Paananen J., Lindstrom J., Lankinen M.A., Shi L., Kuuisto J., Pihlajamaki J., Auriola S., Lehtoten M., Rolandsson O., Bergdahl I.A., Nordin E., Ilanne-Parikka P., Keinanen-Kuikaanniemi S., Landberg R., Eriksson J.G., Tuomilento J., Hanhineva K., Uusitupa M.* // Scientific reports. 2017. V. 7. № 46337.
10. *Behdheim P.E., Poeggeler B., Neria E., Ziv V., Pappolla M.A., Chain D.C.* // J. Mol. Neurosci. 2002. V. 19. P. 213.
11. *Бринкевич С.Д.* // Химия высоких энергий. 2015. Т. 49. № 2. С. 83.
12. *Allen A.O., Hochanadel C.J., Ghormley J.A., Davis T.W.* // J. Phys. Chem. 1952. V. 56. № 5. P. 575.
13. *Бринкевич С.Д., Малиборский А.Я., Капусто И.А., Свердлов Р.Л., Григорьев Ю.В., Ивашкевич О.А., Шадыро О.И.* // Химия высоких энергий. 2019. Т. 53. № 2. С. 140.
14. *Freeman G.R.* // Radiation chemistry of ethanol: a review of data on yields, reaction rate parameters, and spectral properties of transients / Washington: NBS, 1974.
15. *Adams G.E., Willson R.L.* // Trans. Faraday Soc. 1969. V. 65. P. 2981.
16. *Sviardlou R.L., Brinkevich S.D., Shadyro O.I.* // Free Radic. Biol. Med. 2017. V. 108. № 1. P. S38.
17. *Sverdlov R.L., Brinkevich S.D., Shadyro O.I.* // Radiat. Phys. Chem. 2014. V. 98. P. 77.