

УДК 544.52:544.54:547.466

А. А. СЛАДКОВА¹, А. А. СОСНОВСКАЯ¹, И. П. ЕДИМЕЧЕВА¹,
В. А. КНИЖНИКОВ², О. И. ШАДЫРО¹

РАДИАЦИОННО- И ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ

¹Белорусский государственный университет,
Минск, Беларусь

²Институт физико-органической химии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь

Широкое распространение и биологическая значимость аминокислот (АК), пептидов и белков обуславливают неуменияющийся интерес к изучению их свойств. Гидроксилсодержащие АК занимают особое место среди других АК по возможному разнообразию и вероятности радиационно-индуцированных реакций, в которые, исходя из своего строения, они могут вступать. Так, продукты радиолитического разложения воды инициируют дезаминирование треонина (Thr) и серина (Ser) существенно эффективнее, чем других АК [1]. Ди- и трипептиды, имеющие остаток гидроксилсодержащей АК на С-концевом участке молекулы, более склонны к радиационно-индуцированному образованию соответствующих амидов АК, а для дипептидов, имеющих остаток гидроксилсодержащей АК на N-концевом участке молекулы, существенно эффективнее протекает дезаминирование [2]. Однако радиационно-индуцированные процессы с разрушением углеродного скелета молекул гидроксилсодержащих ди- и полипептидов недостаточно изучены. Не исследованы и возможные фотоиндуцированные превращения таких пептидов.

Актуальность исследования гидроксилсодержащих АК и пептидов, имеющих в своем составе остатки таких АК, обусловлена тем, что исследуемые объекты играют важную роль в функционировании биосистем. Thr является незаменимой для человека и животных АК. Ser — основной источник нейротрансмиттера глицина в центральной нервной системе, участвует в биосинтезе цистеина, метионина, сфинголипидов, пуриновых и пиримидиновых оснований [3, 4]. Остатки Ser и Thr встречаются во всех организмах в составе молекул пептидов и белков, часто в большом количестве на внешней стороне макромолекул вследствие своей гидрофильной природы. Благодаря подвижному атому водорода гидроксильной группы остатки этих АК часто являются донорами водорода для ферментов. Фосфорилирование остатков гидроксилсодержащих АК протеинкиназами, как правило, изменяет или модифицирует функции субстрата, при этом может изменяться ферментативная активность, положение белка в клетке или взаимодействие с другими белками [4].

В настоящей работе изучены свободнорадикальные превращения треонил-треонина (Thr-Thr), треонилвалина (Thr-Val), валилтреонина (Val-Thr), валилвалина (Val-Val), серилаланина (Ser-Ala) и N-стеароил-Thr при действии на их водные растворы и дисперсии γ - и УФ-излучения. Исследовано влияние α , β -аминоспиртового фрагмента, содержащегося на N- и C-концевом участках молекулы дипептида, на способность последнего подвергаться радиационно- и фотоиндуцированной деструкции с разрывом —C—C— связи.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Thr-Thr, Thr-Val, Val-Thr, Val-Val были синтезированы, как описано в [5], N-стеароил-Thr был предоставлен д. х. н. М. А. Киселем (Институт биоорганической химии НАН Беларуси). Для подтверждения структуры соединений использовали спектроскопию ^1H -ЯМР, ИК и масс-спектроскопию. Ser-Ala был от фирмы «Aldrich». Чистота веществ составляла не менее 97 %.

Водные растворы исследуемых соединений готовили на бидистиллированной воде. Необходимая величина pH достигалась прибавлением растворов хлорной кислоты и гидроксида натрия. Исследуемые растворы помещали в ампулы и продували аргоном в течение 45 мин для удаления кислорода.

Липосомы N-стеароил-Thr получали диспергированием тонкой липидной пленки в фосфатном буфере согласно [6].

Приготовленные образцы облучали на γ -установке с источником излучения ^{60}Co , мощность дозы — $(0,39 \pm 0,01)$ Гр/с. Для определения мощности поглощенной дозы использовался дозиметр Фрикке ($G(\text{Fe}^{3+}) = 15,06$ ионов/100эВ). Интервал поглощенных доз составил 0,47–1,87 кГр.

УФ-облучение проводили сплошным спектром дуговой ртутной трубчатой лампы высокого давления (ДРТ-100). Мощность дозы поглощенного излучения измерялась с использованием стандартного ферриоксалатного актинометра на длинах волн 230–280 нм [7], она составила $(5,0 \pm 0,3) \cdot 10^{15}$ квант/с. Время облучения было 10–80 мин.

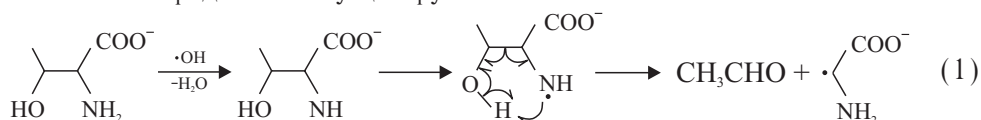
Анализ карбонильных продуктов радиолита и фотолиза осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии после проведения реакции карбонильных соединений с 2,4-динитрофенилгидразином, как описано в [8].

Радиационно-химические и квантовые выходы образования веществ рассчитывали из данных по их накоплению в зависимости от поглощенной дозы излучения. В использованном интервале поглощенных доз концентрации продуктов радиолита и фотолиза увеличивались линейно с ростом дозы облучения. Усреднение результатов и определение значения погрешности проводились по методу наименьших квадратов (с использованием программы Microsoft Excel).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дипептиды Thr-Thr, Thr-Val и Ser-Ala содержат на N-концевом участке молекулы α , β -аминоспиртовый фрагмент, т. е. имеют в своем составе свободную аминогруппу в β -положении по отношению к гидроксильной группе. Ранее нами

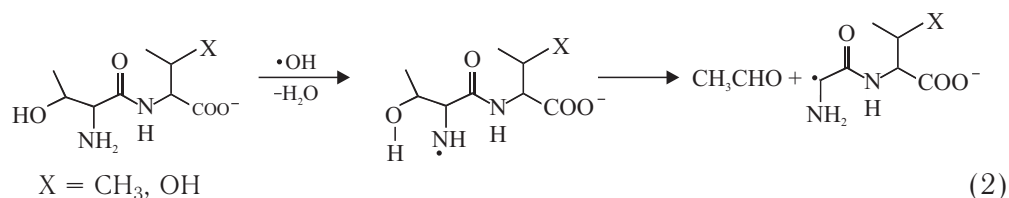
было показано [8], что Thr в водных растворах может подвергаться деструкции с элиминированием боковой цепи молекул через образование азотцентрированных радикалов и их последующую фрагментацию по согласованному механизму через пятичленное переходное состояние с одновременным разрывом двух вицинальных по отношению к радикальному центру связей:



Молекулярным продуктом данного процесса деструкции является ацетальдегид. Можно полагать, что в случае дипептидов, имеющих в своем составе остатки гидроксилсодержащих АК, возможна реализация аналогичных процессов, приводящих к разрушению углеродного скелета исходных молекул.

Для установления закономерностей протекания радиационно-индуцированных процессов деструкции по $-\text{C}-\text{C}-$ связи гидроксилсодержащих дипептидов нами были определены состав и выходы карбонильных продуктов радиолитических нейтральных и щелочных 0,1 М водных растворов Thr-Thr, Thr-Val, Val-Thr, а также 0,02 М растворов Ser-Ala. В табл. 1 приведены выходы основных карбонильных продуктов радиолитических исследованных дипептидов — ацетальдегида и формальдегида. Другие карбонильные продукты, такие как ацетон и пропионовый альдегид, в облученных растворах отсутствовали либо образовывались с выходами, не превышающими $(0,05 \pm 0,01)$ молекула/100 эВ.

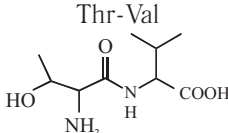
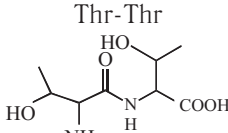
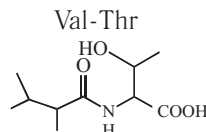
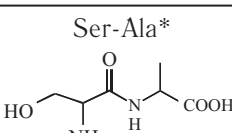
Как видно из экспериментальных данных (см. табл. 1), выходы ацетальдегида при радиолитическом разложении растворов Thr-Thr и Thr-Val значительны уже при pH 7,0, при переходе же от нейтральных к щелочным растворам выходы данного продукта деструкции существенно возрастают. Процесс $-\text{C}-\text{C}-$ деструкции данных дипептидов можно представить следующей схемой:



Увеличение выходов продукта элиминирования боковой цепи с возрастанием pH облучаемых растворов можно объяснить тем, что депротонированная аминогруппа в органических соединениях более реакционноспособна по отношению к $\cdot\text{OH}$ радикалам [9] и в щелочной среде интенсифицируется процесс образования азотцентрированных радикалов с последующей их фрагментацией по предложенному механизму. Процесс отщепления боковой цепи Thr с образованием ацетальдегида не протекает в том случае (см. табл. 1), когда Thr находится на C-концевом участке дипептида (Val-Thr).

Таблица 1

Радиационно-химические выходы G (молекула/100эВ) образования основных карбонильных продуктов радиолитического деаэрирования водных растворов дипептидов

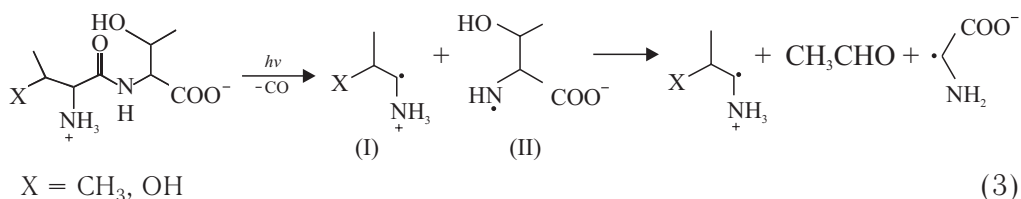
Исходные вещества	Продукты радиолитического деаэрирования	pH	
		7,0	12,0
Thr-Val 	CH ₃ CHO	0,58 ± 0,05	1,36 ± 0,16
Thr-Thr 	CH ₃ CHO	0,46 ± 0,04	1,32 ± 0,21
Val-Thr 	CH ₃ CHO	0	0
Ser-Ala* 	CH ₂ O	0,33 ± 0,05	0,65 ± 0,05
	CH ₃ CHO	0,010 ± 0,003	0

* концентрация 0,02 моль/дм³

В случае Ser-Ala продуктом деструкции углеродного скелета дипептида по согласованному механизму является формальдегид (см. табл. 1), образование которого может происходить по схеме, аналогичной (2). Как следует из экспериментальных данных, формальдегид является основным карбонильным продуктом деструкции данного дипептида.

Известно, что белки играют важную роль практически во всех фотобиологических процессах и являются значимыми объектами фотоповреждения [10]. При поглощении УФ-излучения карбонилсодержащие соединения подвергаются распаду по Норришу типа I [7].

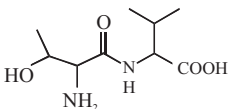
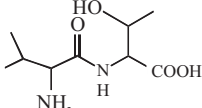
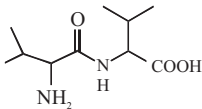
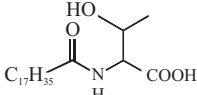
В случае дипептидов фотоиндуцированный распад по Норришу типа I может приводить к разрушению пептидной связи и образованию азотцентрированных и α -аминосодержащих углеродцентрированных радикалов исследуемых дипептидов. Образовавшиеся таким образом азотцентрированные радикалы могут далее фрагментировать по согласованному механизму с накоплением в случае Thr-содержащих дипептидов молекулярного продукта — ацетальдегида. Протекание этого процесса можно представить с помощью следующей схемы:



В настоящей работе нами получены количественные данные по квантовым выходам карбонильных продуктов фотолиза Thr-Thr, Val-Thr и Val-Val, свидетельствующие о реализации процессов фотоиндуцированной деструкции дипептидов (табл. 2).

Таблица 2

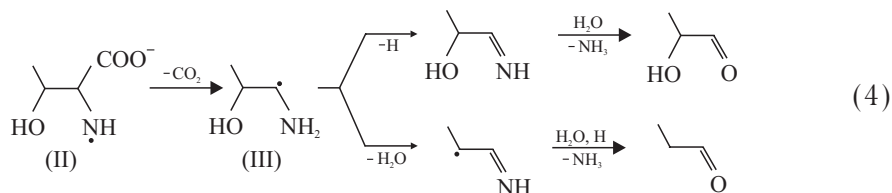
Выходы Φ (молекула/квант) образования основных карбонильных продуктов фотолиза 0,1 М деаэрированных водных растворов исследуемых соединений (pH 4,5–5,0)

Исходные вещества	Продукты фотолиза	$\Phi \cdot 10^4$
Thr-Thr 	CH ₃ CHO	25,0 ± 2,0
	CH ₃ CH ₂ CHO	1,0 ± 0,1
	CH ₃ CH(OH)CHO	0,8 ± 0,1
Val-Thr 	CH ₃ CHO	10,0 ± 0,6
	CH ₃ CH ₂ CHO	0,5 ± 0,1
	CH ₃ CH(OH)CHO	1,5 ± 0,2
	(CH ₃) ₂ CHCHO	3,0 ± 0,2
Val-Val 	(CH ₃) ₂ CHCHO	5,9 ± 0,3
N-стеароил-Thr* 	CH ₃ CHO	10,0 ± 0,9
	CH ₃ CH ₂ CHO	1,0 ± 0,1
	C ₁₇ H ₃₆	2,0 ± 0,1

* 0,01 М водные дисперсии

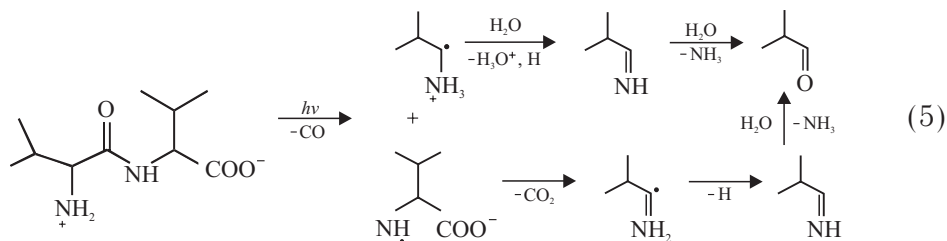
Как следует из экспериментальных данных, ацетальдегид действительно является основным карбонильным продуктом фотолиза Val-Thr и Thr-Thr, что свидетельствует о возможности протекания УФ-индуцированной деструкции исходных веществ по схеме (3).

Образование при фотолизе этих дипептидов пропионового и 2-гидрокси-пропионового альдегидов можно объяснить дальнейшими превращениями α -аминосодержащих углеродцентрированных радикалов (III), которые могут появляться при декарбоксилировании первоначально образовавшихся азотцентрированных радикалов Thr (II):

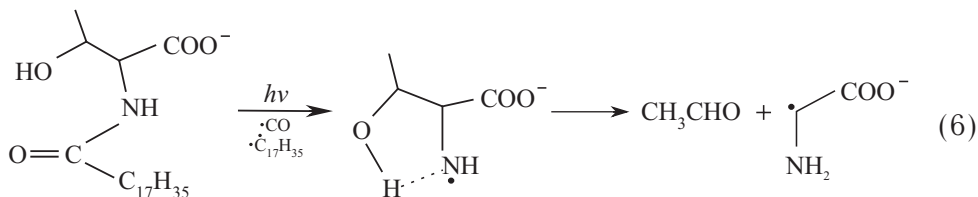


В случае Val-Thr еще одним карбонильным продуктом фотодеструкции является изобутиральдегид. Он может образовываться из α -аминосодержащих углеродцентрированных радикалов (I) после их окисления до иминов и последующего гидролиза.

Изобутиральдегид является единственным карбонильным продуктом фотолиза Val-Val. Его квантовый выход выше, чем в случае Val-Thr. Это может быть связано с возможностью образования данного продукта как из α -аминосодержащих углеродцентрированных радикалов, так и из азотцентрированных радикалов после их декарбоксилирования и гидролиза иминов:



Анализ продуктов, образующихся при фотолизе водных дисперсий N-стеароил-Thr, показал, что, как и в случае Thr-Thr и Val-Thr, ацетальдегид является основным карбонильным продуктом фотодеструкции этого соединения (см. табл. 2). Схема фотоиндуцированной деструкции N-стеароил-Thr с разрушением углеродного скелета молекулы может быть представлена следующим образом:



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на возможность реализации нового пути радиационно- и фотоиндуцированной свободнорадикальной деструкции дипептидов, содержащих остатки гидроксилсодержащих АК, а также амидов таких АК за счет образования азотцентрированных радикалов молекул исходных соединений и последующего их распада с разрывом углеродного скелета.

Установленные закономерности важны для выяснения механизмов повреждения АК, пептидов и белков, обусловленного повышенным уровнем активных форм кислорода, а также действием γ - и УФ-излучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шадыро О. И., Сосновская А. А., Врублевская О. Н.* // Химия высоких энергий. 1999. Vol. 33. P. 94–98.
2. *Shadyro O. I., Sosnovskaya A. A., Vrublevskaya O. N.* // J. Radiat. Biol. 2003. Vol. 79. № 4. P. 269–279.
3. *Hernandes M. S., Troncone L. R. P.* // J. Neural. Transm. 2009. Vol. 116. P. 1551–1560.
4. *Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M.* // Principles of Biochemistry, 3rd ed. / New York : Worth Publishing, 2000.
5. *Черевин М. С., Гулевич Т. Г., Юрашевич Н. Я.* [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2008. № 2. С. 52–55.
6. *Лисовская А. Г., Сосновская А. А., Шадыро О. И.* [и др.] // Химия высоких энергий. 2009. Т. 43. С. 496–500.
7. *Калверт Дж., Питтс Дж.* // Фотохимия / под ред. Р. Ф. Васильева. М. : Мир, 1968.
8. *Сосновская А. А., Сладкова А. А., Добриденев И. С., Шадыро О. И.* // Химия высоких энергий. 2009. Т. 43. С. 487–490.
9. *Simic M., Neta P., Hayon E.* // Int. J. Radiat. Phys. Chem. 1971. Vol. 3. P. 309–320.
10. *Kerwin B. A., Remmele R. L. Jr.* // J. Pharm. Sci. 2007. Vol. 96. № 6. P. 1468–1479.

Поступила в редакцию 30.03.2012.

УДК 544.52:544.54:547.466

Сладкова А. А., Сосновская А. А., Едимечева И. П., Книжников В. А., Шадыро О. И. Радиационно- и фотоиндуцированная свободнорадикальная деструкция гидроксилсодержащих дипептидов // Свиридовские чтения: сб. ст. Вып. 8. Минск, 2012. С. 225.

Установлено, что разрушение углеродного скелета в молекулах дипептидов, содержащих остаток серина или треонина на N-концевом участке молекулы, при радиоллизе их водных растворов определяется наличием непротонированной аминогруппы, доступной для атаки электрофильного радикала $\bullet\text{OH}$. Процесс разрыва углерод-углеродной связи в молекулах таких соединений происходит вследствие фрагментации образующихся азотцентрированных радикалов, которая может осуществляться по согласованному механизму с одновременным разрывом двух вицинальных по отношению к радикальному центру связей. Показана возможность генерации азотцентрированных радикалов треонина, об-

разующихся за счет распада по Норришу типа I молекул треонилтреонина, валилтреонина и N-стеароил-треонина, и дальнейшей их фрагментации по согласованному механизму с образованием ацетальдегида при УФ-облучении этих соединений.

Библиогр. 10 назв., табл. 2.

Sladkova A. A., Sosnovskaya A. A., Edimecheva I. P., Knizhnikov V. A., Shadyro O. I.
Radiation- and photoinduced free-radical destruction of hydroxyl-containing dipeptides //
Sviridov readings. Iss. 8. Minsk, 2012. P. 225.

It has been established that carbon skeleton destruction in dipeptides molecules, containing threonine or serine residues in N-terminal side-chain of the molecule, under radiolysis of their aqueous solutions is determined by the presence of unprotonated amino group which is accessible to electrophilic $\cdot\text{OH}$ radical attack. The process of carbon-carbon bond rupture in such compounds molecules occurs owing to the formed nitrogen-centered radicals fragmentation, which can be carried out by means of the co-ordinated mechanism with simultaneous rupture of two vicinal to the radical centre bonds. The possibility of threonine N-centered radicals generation, which are formed due to Norrish type I disintegration of threonylthreonine, valylthreonine and N-stearoylthreonine molecules, and of their further fragmentation by means of the co-ordinated mechanism with acetaldehyde formation under UV-irradiation of these compounds has been shown