

**КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ
ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗ**

УДК 544.431.7

**КИНЕТИЧЕСКИЙ ИЗОТОПНЫЙ Н/Д-ЭФФЕКТ РАСТВОРИТЕЛЯ
ПРИ ОКИСЛЕНИИ МЕТИЛЛИНОЛЕАТА В МИЦЕЛЛАХ TRITON X-100**

© 2022 г. И. В. Москаленко^{1*}, И. В. Тихонов¹¹Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия

*E-mail: i.v.m.rostov.yar@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2021;

после доработки 01.10.2021;

принята в печать 20.11.2021

Исследовано влияние тяжелой воды на скорость окисления метиллинолеата в мицеллах Triton X-100. Установлено, что скорость окисления в тяжелой воде повышается за счет обмена гидропероксидных радикалов (HO_2^\cdot) на дейтеропероксидные (DO_2^\cdot), что приводит к уменьшению скорости обрыва цепей. Образование DO_2^\cdot подтверждено уменьшением коэффициентов ингибирования нитроксильными радикалами, а реакция DO_2^\cdot с молекулой метиллинолеата – снижением скорости окисления в присутствии супероксиддисмутазы.

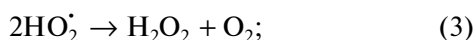
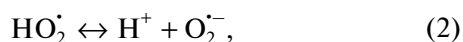
Ключевые слова: кинетический изотопный эффект растворителя, полиненасыщенные жирные кислоты, пероксидное окисление липидов, гидропероксидный радикал, тяжелая вода.

DOI: 10.31857/S0207401X22070123

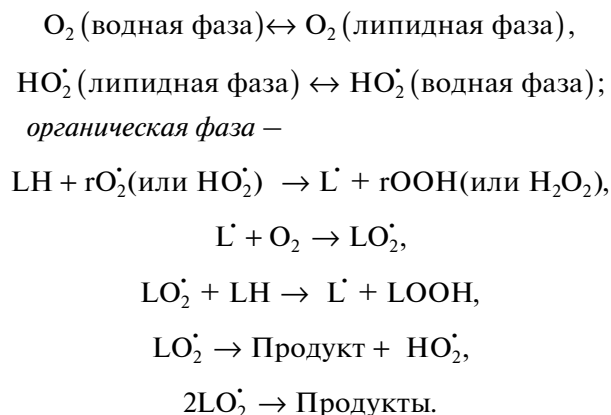
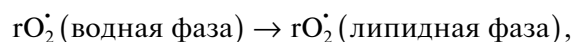
Гидропероксидный радикал (HO_2^\cdot) играет важную роль в механизме окисления органических соединений, в том числе полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в биологических системах [1–5]. Его участие проявляется, в частности, в обнаруженном кинетическом изотопном Н/Д-эффекте (КИЭ) [6–8]. Предполагается, что замена водорода на дейтерий может сказаться и на процессах инициирования цепного окисления ПНЖК [9]. Ведущие в этом направлении исследования очень важны, поскольку обнаружено, что тяжелая вода (D_2O) может сдерживать распространение раковых клеток [10]. При этом практически не изучено влияние D_2O на кинетику окисления ПНЖК.

В качестве кинетической модели окисления клеточных мембран удобно использовать иницированное 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом (ААРН) окисление эфиров ПНЖК, в частности метиллинолеата (ЛН), в мицеллах Triton X-100 [7]. В данном процессе образуется радикал HO_2^\cdot [11]:

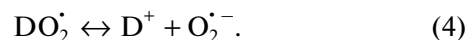
водная фаза –



диффузия –



Учитывая, что в водной фазе гидропероксидный радикал диссоциирует по реакции (2) [12], в тяжелой воде обратный процесс ассоциации $\text{O}_2^{\cdot-}$ будет происходить с катионом D^+ по приведенной ниже реакции, в результате которой образуется дейтеропероксидный радикал:



Таким образом, окисление метиллинолеата в мицеллах в среде тяжелой воды является удобной системой для исследования реакционной способности DO_2^\cdot в реакциях окисления ПНЖК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались следующие реактивы: азоинициатор – ААРН, мицеллообразователь –

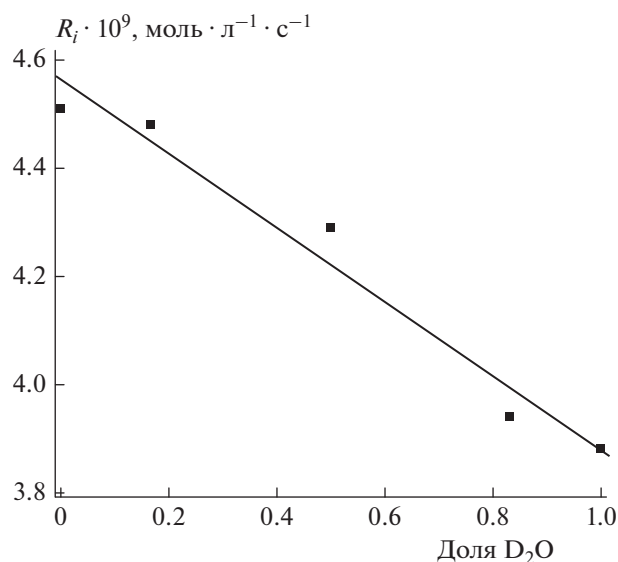
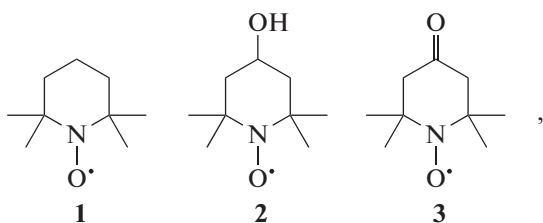


Рис. 1. Зависимость скорости иницирования ЛН в мицеллах от изотопного состава растворителя.

Triton X-100, субстрат окисления — метилинолеат, ингибитор — 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ол (С1); все реактивы производства компании Sigma-Aldrich (USA). Супероксиддисмутаза (СОД) из бычьей печени применялась как акцептор супероксидных радикалов. Нитроксильные радикалы >NO^\bullet :



были синтезированы В.Д. Сенем (ИПХФ РАН), за что авторы выражают ему благодарность.

Фосфатный буфер с $\text{pH(pD)} = 7.4$ готовили из растворов NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 на основе деионизованной воды (H_2O) или тяжелой воды (D_2O). Значения pD измеряли на стеклянном электроде, используя соотношение $\text{pD} = \text{pH} + 0.41$ [13]. Растворы на основе H_2O очищали от следов металлов переменной валентности с помощью смолы Chel-ex-100 производства компании Bio-Rad Lab., Inc. (USA). В растворы на основе D_2O добавляли Трилон В (Sigma-Aldrich, USA), общая концентрация которого в растворах составляла 5 мМ.

Окисление ЛН ($0.01 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) исследовали в мицеллах Triton X-100 ($0.05 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) в фосфатном буфере ($0.05 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$, $\text{pH(pD)} = 7.4$) под действием инициатора ААРН ($0.008 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) при 310 К. Кинетику поглощения кислорода при окис-

лении ЛН изучали с использованием кислородного биологического монитора YSI 5300A (USA). Скорость иницирования R_i определяли методом ингибиторов по времени окончания периода индукции τ_{ind} с помощью соотношения

$$R_i = \frac{2[\text{InH}]_0}{\tau_{ind}},$$

где $[\text{InH}]$ — концентрация С1. Величины τ_{ind} определяли интегральным методом [14] по уравнению

$$\tau_{ind} = \int_0^\infty \left(1 - \left(\frac{R}{R_0} \right)^2 \right) dt,$$

где R_0 и R — скорость окисления в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно.

Коэффициент ингибирования (f) для >NO^\bullet определяли по уравнению

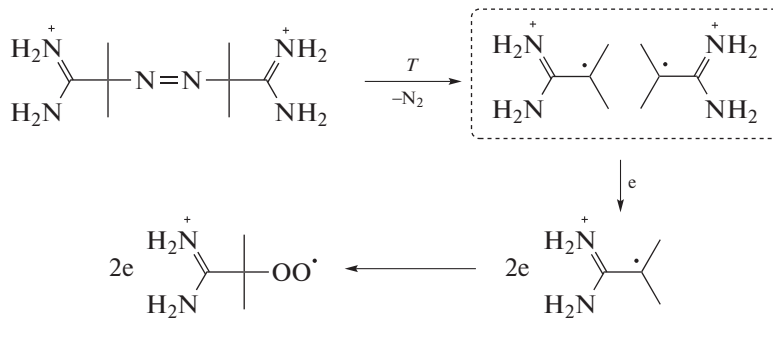
$$f = \tau_{ind} R_i / [\text{>NO}^\bullet]^{-1}.$$

Значения логарифмов коэффициентов распределения ($\lg P$) в системе октанол—вода взяты из работы [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость окисления (R) метилинолеата в растворе на основе тяжелой воды несколько выше, чем в растворе легкой воды: $2.4 \cdot 10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и $2.0 \cdot 10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно. Радиально-цепное окисление протекает по сложному механизму (см. выше), поэтому некорректно сравнивать скорости окисления напрямую. Наиболее удобной величиной для определения КИЭ является длина цепи $\nu = R/R_i$. Для ее определения необходимо уточнить значение скорости иницирования ААРН в тяжелой воде. На рис. 1 представлена зависимость скорости иницирования от доли тяжелой воды. Эта зависимость является линейной функцией. Из рис. 2 видно, что при одинаковой концентрации ингибитора период индукции выше в случае раствора на основе тяжелой воды. Для стадии иницирования КИЭ $= R_i(\text{H}_2\text{O})/R_i(\text{D}_2\text{O}) = 1.16 \pm 0.10$. Низкие значения КИЭ характерны для реакций ионного обмена [16]. Видимо, данный эффект связан с уменьшением доли протонированных амидиновых групп ААРН [17] в тяжелой воде (Схема 1). Это может уменьшать кулоновское отталкивание генерируемых углерод-центрированных радикалов, что приводит к более низкой эффективности выхода радикала из клетки (e) и уменьшению R_i [17].

Схема 1. Клеточный эффект при распаде ААРН

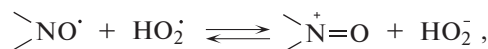


Длина цепи окисления по данным рис. 2 составила 44 ± 4 для легкой воды и 62 ± 6 для тяжелой воды. Таким образом, кинетический изотопный эффект окисления метиллинолеата в мицеллах будет равен КИЭ = $v(H_2O)/v(D_2O) = 0.71 \pm 0.07$. Причинами увеличения длины цепи могут быть уменьшение скорости обрыва цепи и/или увеличение скорости передачи цепи между мицеллами.

Константа скорости обрыва цепи по реакции (3) для DO_2^{\cdot} значительно ниже, чем для HO_2^{\cdot} [18]. Превращением HO_2^{\cdot} в DO_2^{\cdot} в среде тяжелой воды можно объяснять увеличение скорости окисления. Таким образом, нужно доказать сам факт образования радикала DO_2^{\cdot} и убедиться, что он продолжает цепи окисления. Наличие DO_2^{\cdot} можно зафиксировать с помощью нитроксильных радикалов: известно, что >NO^{\cdot} не реагирует с DO_2^{\cdot} , что

снижает коэффициент ингибирования [19, 20]. В работах [21, 22] показано, что при окислении ЛН в мицеллах происходит регенерация нитроксильных радикалов, механизм которой представлен ниже:

водная фаза –



органическая фаза –

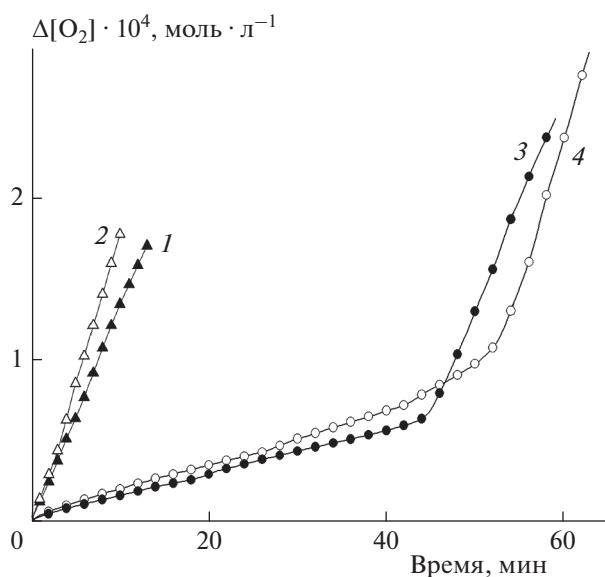
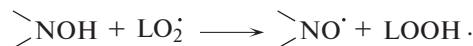


Рис. 2. Кинетические кривые окисления ЛН в мицеллах без ингибитора (1, 2) и в присутствии $6 \cdot 10^{-6}$ моль \cdot л $^{-1}$ С1 (3, 4) в среде H_2O (1, 3) и D_2O (2, 4).

Регенерация >NO^{\cdot} идет при взаимодействии с HO_2^{\cdot} как в органической фазе через образование гидроксилamina [19, 23], так и в водной фазе через образование оксоаммониевого катиона [24, 25].

В табл. 1 приведены значения f для ряда нитроксильных радикалов, имеющих различные значения $\lg P$. Из этой таблицы видно, что падение f тем сильнее, чем выше липофильность >NO^{\cdot} . Таким образом, при замене H_2O на D_2O снижение степени регенерации происходит преимущественно в органической фазе, поскольку отрыв нитроксильным радикалом атома дейтерия от радикала DO_2^{\cdot} гораздо менее вероятен, чем отрыв атома водорода от радикала HO_2^{\cdot} . В водной же среде аналогичная реакция протекает по механизму переноса электрона, который менее подвержен влиянию изотопных эффектов.

Для >NO^{\cdot} 1 определены значения f в смесях D_2O и H_2O (табл. 2). Как видно, коэффициент ингибирования падает при увеличении доли тяжелой воды. Можно полагать, что в результате реак-

Таблица 1. Значения коэффициентов ингибирования для ряда нитроксильных радикалов в среде H₂O и D₂O

>NO^\bullet	$f(\text{H}_2\text{O})$	$f(\text{D}_2\text{O})$	$f(\text{H}_2\text{O})/f(\text{D}_2\text{O})$	$\lg P$
1	3.23	1.36	2.38	1.40
2	5.2	2.9	1.79	0.90
3	1.15	0.7	1.64	0.50

Таблица 2. Зависимость коэффициентов ингибирования для >NO^\bullet 1 от изотопного состава растворителя

Доля тяжелой воды	f
0	3.25
0.2	3.08
0.5	2.95
0.84	1.59
1	1.36

ций (2) и (4) происходит частичная замена HO_2^\bullet на DO_2^\bullet , что приводит к уменьшению значений f .

При окислении ЛН в среде D₂O происходит передача цепи между мицеллами при участии радикалов HO_2^\bullet (DO_2^\bullet), как и в среде H₂O [11, 21]. Это подтверждается влиянием СОД на кинетику процесса. При концентрации СОД 100 Ед/мл скорость окисления ЛН в среде D₂O снизилась на 24.3%. Супероксиддисульфида селективно реагирует с $\text{O}_2^{\bullet-}$, снижая тем самым концентрацию HO_2^\bullet [11, 22], а следовательно, и концентрацию DO_2^\bullet . В результате уменьшается эффективность передачи цепи между мицеллами, что приводит к снижению скорости окисления ЛН в среде D₂O.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Образующийся при окислении метиллинолеата гидропероксидный радикал в результате обратимого депротонирования/протонирования обменивается в тяжелой воде на радикал DO_2^\bullet , который также ведет цепи окисления, но значительно медленнее участвует в их обрыве. Подтверждением образования DO_2^\bullet является снижение коэффициента ингибирования нитроксильными радикалами, которое связано с невозможностью реакции DO_2^\bullet с >NO^\bullet . Кинетический изотопный эффект растворителя при окислении метиллинолеата в мицеллах составил 0.71. При этом в тяжелой воде незначительно снижается скорость иницирования.

Авторы благодарят профессора Е.М. Плисса за полезную дискуссию.

Работа выполнена при поддержке Российским научным фондом (грант 20-13-00148).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Рогинский В.А.* // Кинетика и катализ. 1996. Т. 37. № 4. С. 521.
2. *Yin H., Xu L., Porter N.A.* // Chem. Rev. 2011. V. 111. № 10. P. 5944.
3. *Panov A.* // Mol. Biol. 2018. V. 52. № 3. P. 295.
4. *Poon J., Zilka O., Pratt D.A.* // J. Amer. Chem. Soc. 2020. V. 142. № 33. P. 14331.
5. *Пучков С.В., Непомнящих Ю.В.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 3. С. 42.
6. *Тихонов И.В., Москаленко И.В., Плисс Е.М. и др.* // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 5. С. 14.
7. *Москаленко И.В., Тихонов И.В., Плисс Е.М. и др.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 11. С. 25.
8. *Soloviev M., Moskalenko I., Pliss E.* // Reac. Kin. Mech. Cat. 2019. V. 127. № 2. P. 561.
9. *Pinchuk I., Lichtenberg D.* // Chem. Phys. Lipids. 2017. V. 205. P. 42.
10. *Fulczyk A., Lata E., Talik E., Kowalska T., Sajewicz M.* // Front. Chem. 2020. V. 8. P. 541.
11. *Roginsky V., Barsukova T.* // Chem. Phys. Lipids. 2001. V. 111. № 1. P. 87.
12. *Bielski B.H.J., Cabelli D.E., Arudi R.L.* // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1985. V. 14. № 4. P. 1041.
13. *Covington A.K., Paabo M., Robinson R.A., Bates R.G.* // Anal. Chem. 1968. V. 40. № 4. P. 700.
14. *Loshadkin D., Roginsky V., Pliss E.* // Intern. J. Chem. Kinet. 2002. V. 34. № 3. P. 162.

15. Wang Y., Xiao J., Suzek T.O. et al. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 40. № D1. P. D400.
16. Amorati R., Baschieri A., Morrioni G., Gambino R., Valgimigli L. // Chem. Eur. J. 2016. V. 22. № 23. P. 7924.
17. Musialik M., Kita M., Litwinienko G. // Org. Biomol. Chem. 2008. V. 6. № 4. P. 677.
18. Assali M., Rakovsky J., Votava O., Fittschen C. // Intern. J. Chem. Kinet. 2020. V. 52. № 3. P. 197.
19. Baschieri A., Valgimigli L., Gabbanini S. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 2018. V. 140. № 32. P. 10354.
20. Harrison K.A., Haidasz E.A., Griesser M., Pratt D.A. // Chem. Sci. 2018. V. 9. № 28. P. 6068.
21. Тихонов И.В., Плисс Е.М., Бородин Л.И., Кузнецова Т.А., Сень В.Д. // Изв. АН. Сер. хим. 2015. №. 10. С. 2438.
22. Тихонов И.В., Плисс Е.М., Бородин Л.И., Сень В.Д. // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 6. С. 20.
23. Pliss E., Soloviev M., Sen' V. et al. // Reac. Kinet. Mech. Cat. 2021. V. 132. № 2. P. 617.
24. Sen V.D., Tikhonov I.V., Borodin L.I. et al // J. Phys. Org. Chem. 2015. V. 28. № 1. P. 17.
25. Тихонов И.В., Бородин Л.И., Плисс Е.М. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 11. С. 3.