

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ -ОПОСРЕДОВАННУЮ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНУЮ ФРАГМЕНТАЦИЮ ГЛИЦЕРОФОСФАТА В ПРИСУТСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2023 г. Е. М. Овсянникова¹, И. О. Солонинкина¹, И. Л. Юркова^{1,2,*}

¹ Белорусский государственный университет, ул. Ленинградская 14, Минск, 220030 Беларусь

² Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: yurkovail@tut.by

Поступило в редакцию 12 апреля 2023 г.

После доработки 16 июня 2023 г.

Принято к печати 22 июня 2023 г.

Изучено влияние N-ацетилцистеина на гомолитическую фрагментацию β -глицерофосфата с разрывом фосфоэфирной связи. Установлено, что N-ацетилцистеин усиливает фрагментацию, индуцированную $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})-\text{H}_2\text{O}_2$, и ингибирует радиационно-инициированный процесс. Активирующий эффект N-ацетилцистеина на $(\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2)$ -опосредованную фрагментацию в присутствии соединений, способных воздействовать на уровень $\text{HO}^\bullet$, соотношение $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ или взаимодействовать с тиолом, усиливается (тролокс, убихинон Q_0), либо переключается на протекторный (NaN_3 , Мет, аскорбат). В присутствии Fe^{2+} тролокс в отличие от Q_0 снижает стимулирующее действие N-ацетилцистеина.

Ключевые слова: N-ацетилцистеин, глицерофосфат, свободнорадикальная фрагментация, гидроксильный радикал, тролокс, убихинон Q_0

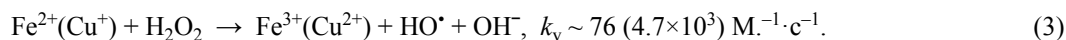
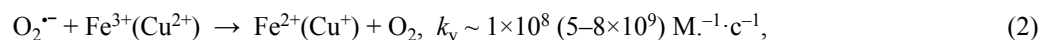
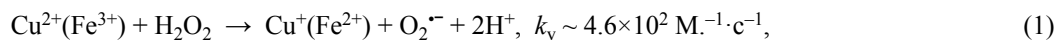
DOI: 10.31857/S0044460X23070119, **EDN:** HGWVZK

N-Ацетил-L-цистеин (N-ацетилцистеин), производное L-цистеина, встречающееся в природе в растениях рода *Allium*, применяют в качестве муколитика для лечения респираторных заболеваний с 60-х годов XX века [1]. В настоящее время интерес к N-ацетилцистеину как средству, способному регулировать различные патологии (неврологические и психические расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, воспаления, вирусные инфекции и др.) [1–5], включая химиопрофилактику рака [4, 6, 7], неуклонно растет. Ключевым аспектом при рассмотрении терапевтического потенциала N-ацетилцистеина является его способность регулировать окислительный стресс [1–4], который в организме сопряжен с дисбалансом антиок-

сидантов и активных форм кислорода ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HClO , $\text{HO}^\bullet$) [8, 9]. Образование активных форм кислорода в низких количествах (окислительный эустресс) может способствовать адаптивному ответу клеток, однако их чрезмерный уровень будет приводить к повреждению биомолекул и развитию патологий (окислительный дистресс) [9].

При тестировании N-ацетилцистеина в различных системах как *in vitro*, так *in vivo* его эффекты, как правило, связывают с прямым или опосредованным антиоксидантным действием [2–4, 10]. С одной стороны, N-ацетилцистеин способен взаимодействовать с активными частицами и хелатировать ионы тяжелых металлов (Ni^{2+} , Co^{2+} и

Схема 1.



др.), и тем самым снижать долю активных форм кислорода, индуцирующих свободно-радикальные повреждения биомолекул. С другой стороны, N-ацетилцистеин может способствовать повышению уровня глутатиона (GSH), основного антиоксидантного биотиола, и восстановлению дисульфидных связей в белках. Недавно предложен механизм непрямого антиоксидантного действия N-ацетилцистеина *in vivo*, базирующегося на его превращении с образованием малых количеств сероводорода и сульфановых соединений серы (персульфиды), обладающих радикал-акцепторными свойствами [11].

Однако, несмотря на большой накопленный материал, молекулярные механизмы, с помощью которых N-ацетилцистеин проявляет свою активность при различных физиологических условиях, до сих пор до конца не выяснены [3, 4, 10, 11]. Влияние N-ацетилцистеина на свободнорадикальные процессы неоднозначно, оно может быть как анти-, так и прооксидантным [10, 12–14]. Это указывает на необходимость более детального изучения радикал-регуляторных свойств N-ацетилцистеина, в частности, в присутствии ионов переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^+ и др.). Последние играют важную роль в развитии окислительного стресса [15–17], так как способствуют образованию гидроксильных радикалов, катализируя разложение H_2O_2 (схема 1). Пероксид водорода (pK_a 11.75, биологическое $t_{1/2} > 1$ мин, концентрация нМ.–мкМ.) можно рассматривать как предшественник $\text{HO}^{\cdot}$ в клетках [18, 19]. H_2O_2 в силу своих физико-химических свойств способен преодолевать большие расстояния и пересекать биомембрану, и, как следствие, проникать в реакционные участки, далекие от места его генерации. Радикалы $\text{HO}^{\cdot}$ (биологическое $t_{1/2} \sim \text{нс}$) инициируют процессы деструкции биомолекул с высокой константой скорости (10^9 – $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) [20] и, соответствен-

но, повреждения клеток, в большей степени, чем любые другие активные формы кислорода.

При определении роли N-ацетилцистеина в регулировании процессов в биомембранах, опосредованных активными формами кислорода, внимание исследователей преимущественно сконцентрировано на его влиянии на пероксидное окисление глицерофосфолипидов, протекающее в их гидрофобной части [14, 21, 22]. Однако свободнорадикальные процессы могут протекать и в полярных фрагментах липидов, в частности реакция свободнорадикальной фрагментации [23]. Данный процесс характерен для гидроксилсодержащих липидов, например кардиолипина, компонента мембран митохондрий – основных источников активных форм кислорода в клетках [24]. При взаимодействии $\text{HO}^{\cdot}$ с гидрофильной частью глицерофосфолипидов образуются α -гидроксилсодержащие углеродцентрированные радикалы с неспаренным электроном в β -положении к фосфоэфирной связи (схема 2) [25–27]. Радикалы распадаются с разрывом фосфоэфирной связи и элиминированием молекулярного продукта – фосфатидной кислоты, как показано на схеме 2 (где R^1 и R^2 – остаток молекулы липида) на примере фосфатидилглицерина. Роль N-ацетилцистеина в регулировании данной реакции в полярной части глицерофосфолипидов не изучена.

Реакция фрагментации с разрывом фосфоэфирной связи через стадию образования первичных α -гидроксилсодержащих углерод-центрированных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})-\text{C}^{\cdot}(\text{OH})-\text{H}_2\text{C}-\text{OR}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2$ и $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})-\text{HC}(\text{OR}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2)-\text{C}^{\cdot}\text{H}(\text{OH})$ { $\text{HC}^{\cdot}(\text{OH})-\text{HC}(\text{OR}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2)-\text{CH}_2(\text{OH})$ } характерна для α - и β -глицерофосфатов ($k_v > 10^6 \text{ с}^{-1}$) соответственно [28, 29]. Последние содержат фрагменты структуры глицерофосфолипидов, и оба могут быть использованы в качестве модельных

Схема 2.

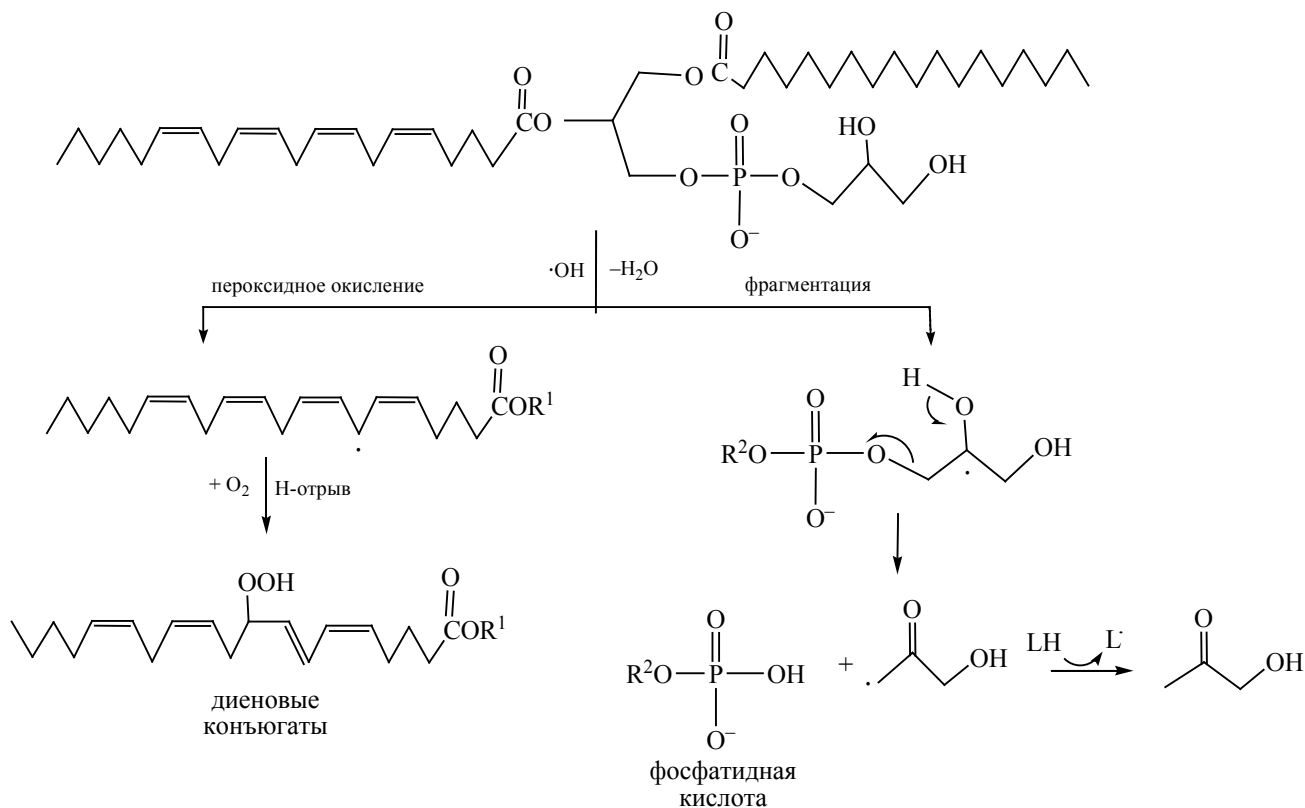
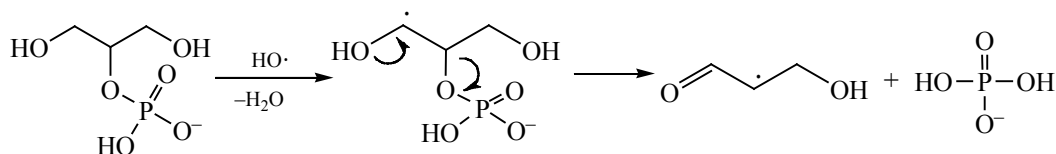


Схема 3.



соединений. Для реализации фрагментации принципиальным является образование радикального центра на атоме С, несущем свободную гидроксильную группу и находящемся в β-положении к фосфатной группе, как показано выше (схема 2) и на схеме 3 для глицеро-2-фосфата, выбор которого предпочтителен для моделирования процесса фрагментации кардиолипина. Выход молекулярного продукта фрагментации глицерофосфата, неорганического фосфата, не зависит от величины рН раствора, как показано при изучении радиационно-инициированного процесса [30].

Задачей данной работы было изучение влияния N-ацетил-L-цистеина на свободнорадикальную

фрагментацию глицеро-2-фосфата с разрывом фосфоэфирной связи преимущественно в условиях $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ -опосредованного образования $\text{HO}^\bullet$ в присутствии различных биологически активных веществ. Степень реализации фрагментации глицеро-2-фосфата в водных растворах оценивали по образованию неорганического фосфата.

На рис. 1а представлены данные по влиянию N-ацетилцистеина на $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ -опосредованную фрагментацию глицеро-2-фосфата. Выявлено, что N-ацетилцистеин (2.5×10^{-4} – 1.0×10^{-2} моль/л) при молярном соотношении N-ацетилцистеин: Cu^{2+} = 1:1 действует нейтрально, при соотношении от 2:1 до 20:1 активизирует гомолитическое дефос-

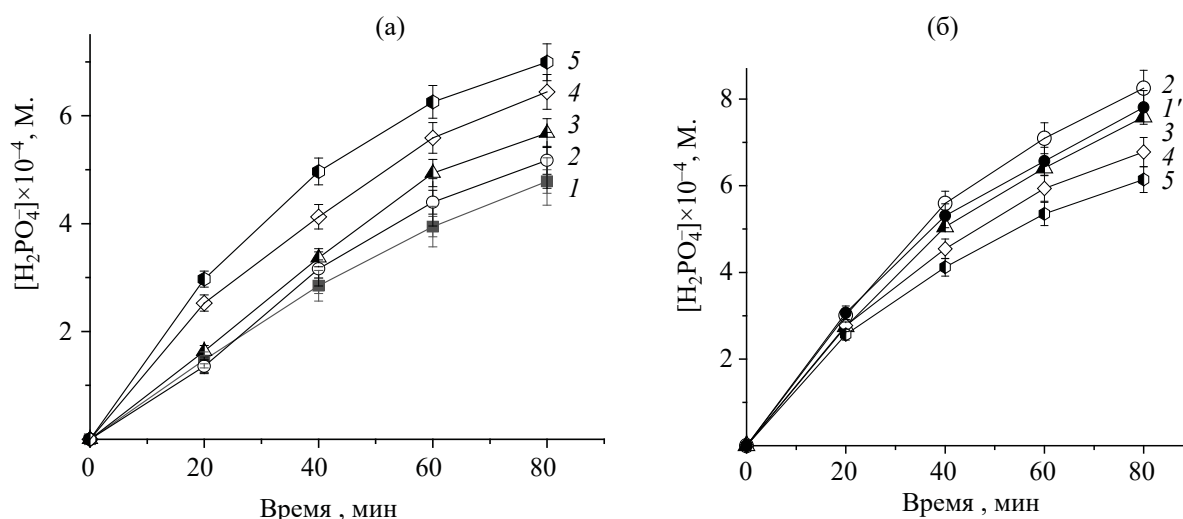


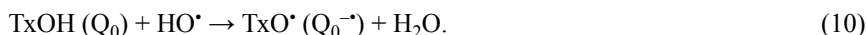
Рис. 1. Накопление H_2PO_4^- в водном растворе глицеро-2-фосфата ($c_{\text{ГФ}} 50 \times 10^{-3}$ моль/л), инкубированном с Cu^{2+} – H_2O_2 (0.25/15 ммоль/л) при 37°C в отсутствие (а) и в присутствии 0.5 ммоль/л аскорбата (б) с добавкой N-ацетилцистеина: 1, 1' – 0; 2 – 0.25; 3 – 0.5; 4 – 1.0; 5 – 5.0 ммоль/л.

форилирование глицеро-2-фосфата. Параллельно исследовали влияние N-ацетилцистеина на фрагментацию глицеро-2-фосфата (ГФ), индуцированную либо редокс-системой FeSO_4 – H_2O_2 (0.5/10.0 ммоль/л), либо γ -излучением. В случае Fe^{2+} -опосредованного процесса N-ацетилцистеин (2.5×10^{-4} – 1.0×10^{-2} моль/л) при молярном соотношении N-ацетилцистеин– Fe^{2+} от 1:2 до 2:1 не оказывает значимого эффекта в сравнении с контролем, от 10:1 до 20:1 интенсифицирует фрагментацию (>2 раза) ($c_{\text{ГФ}}$ 50 ммоль/л). При физическом способе инициирования, основной вклад в который вносят продукты радиолиза воды (частицы Н и $\text{HO}^\bullet$, радиационно-химический выход составляет 0.56 и 2.7 частица/100 эВ, соответственно [20]), N-ацетилцистеин действует как эффективный радиопротектор. Радиационно-химический выход H_2PO_4^- в деаэрированном водном растворе глицеро-2-фосфата ($c_{\text{ГФ}}$ 100 ммоль/л) без добавок составил 3.39 ± 0.30 , в присутствии 2 и 20 ммоль/л N-ацетилцистеина – 1.56 ± 0.11 и 0.83 ± 0.09 молекула/100 эВ соответственно.

N-Ацетилцистеин (RSH) (pK_a 3.24: $-\text{COOH}$, 9.5: $-\text{SH}$) при физиологических условиях (pH 7.4) находится преимущественно в форме моноаниона и только ~1% в виде тиолат-аниона (RS^-) [31], по-

добно большинству тиолов проявляет реакционную способность по отношению к электрофилам и окислителям [19]. Реакции N-ацетилцистеина с H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot -}$ без участия ферментов при нейтральных значениях pH протекают крайне медленно ($k_{\text{H}_2\text{O}_2}$ 0.16, $k_{\text{O}_2^{\cdot -}}$ 68 моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$ [32–34]), и не могут вносить значимый вклад в его действие в выбранных условиях эксперимента. Однако N-ацетилцистеин обладает высокой реакционной способностью по отношению к гидроксильным радикалам ($k_{\text{HO}^\bullet}$ 1.36×10^{10} моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$ [20]). Среди активных форм кислорода радикалы $\text{HO}^\bullet$ являются основными инициаторами образования радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})-\text{HC}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2)-\text{C}^\bullet\text{H}(\text{OH})$ { $\text{HC}^\bullet(\text{OH})-\text{HC}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2)-\text{CH}_2(\text{OH})$ } [28, 29] (схема 4), константа скорости реакции глицеро-2-фосфата с $\text{HO}^\bullet$, как установлено в данной работе методом флуоресцентных зондов, составляет 0.32×10^{10} моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$, что согласуется с указанной в литературе (0.16 – 1×10^{10} моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$ [28]). N-Ацетилцистеин способен эффективно акцептировать $\text{HO}^\bullet$, что должно препятствовать их атаке молекулы глицеро-2-фосфата и, следовательно, ингибированию фрагментации. Этим можно объяснить радиопротекторный эффект N-ацетилцистеина, который согласуется с предыдущими результата-

Схема 4.



ми о влиянии биотиолов на радиационно-иницированную фрагментацию биологически активных фосфопродуктов глицирина [35]. Протекторное действие N-ацетилцистеина может быть обусловлено не только его способностью акцептировать $\text{H}^\bullet$ и $\text{HO}^\bullet$, но и восстанавливать α -гидроксилсодержащие углерод-центрированные радикалы глицеро-2-фосфата $\text{RC}^\bullet\text{H}(\text{OH})$ (схема 4). В результате, N-ацетилцистеин будет препятствовать фрагмен-

тации как на стадии инициирования, так и на стадии развития процесса. Образующиеся тиольные радикалы $\text{RS}^\bullet$ димеризуются или в присутствии кислорода воздуха дают продукты более глубокого окисления [15, 19]. Вклад $\text{RS}^\bullet$ в образование первичных $\text{RC}^\bullet\text{H}(\text{OH})$ из глицеро-2-фосфата представляется маловероятным, в работе [36] показано, что скорость реакции, обратной реакции (6), в 10000 раз ниже, чем прямой.

Активирующий эффект N-ацетилцистеина на $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ -опосредованную фрагментацию указывает на протекание в системе более сложных процессов. N-Ацетилцистеин, вероятно, координирует ионы $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{3+})$ таким образом, что это способствует их восстановлению до $\text{Cu}^+(\text{Fe}^{2+})$ (схема 4), и, как результат, происходит повышение уровня $\text{HO}^\bullet$. Это согласуется с данными, представленными на рис. 2. Стимулирующее влияние N-ацетилцистеина снижается при его комбинации с акцепторами $\text{HO}^\bullet$, азидом натрия и метионином (Met), которые при этом не могут значительным образом влиять на уровень H_2O_2 вследствие неэффективных взаимодействий при pH 7.0 [15]. NaN_3 реагирует с $\text{HO}^\bullet$ с $k_{\text{vHO}^\bullet}$, равной 1.2×10^{10} моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$, с образованием менее активного азидил-радикала ($\text{N}_3^\bullet$) [20]. Met обладает не только высокой $\text{HO}^\bullet$ -акцепторной активностью ($k_{\text{vHO}^\bullet}$ 8.5×10^9 моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$ [20]), но и способен хелатировать $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ [37]. Этим можно объяснить большой ингибиторный эффект N-ацетилцистеина в комбинации с Met, чем с NaN_3 . Надо отметить, что 0.75–10 ммоль/л NaN_3 или Met индивидуально

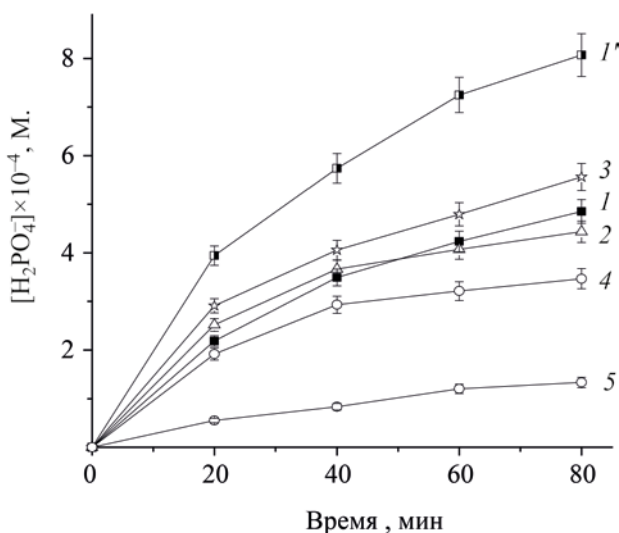


Рис. 2. Накопление H_2PO_4^- в водном растворе глицеро-2-фосфата ($c_{\text{ГФ}} 50 \times 10^{-3}$ моль/л), инкубированном с $\text{Cu}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$ (0.25/15 ммоль/л) при 37°C в отсутствие (1) и в присутствии 5.0 ммоль/л N-ацетилцистеина (1'–6) с добавкой: 1, 1' – 0, 2 – 10.0 ммоль/л NaN_3 ; 3 – 0.75; 4 – 1.5; 5 – 5.0 ммоль/л Met.

Таблица 1. Влияние концентрации N-ацетилцистеина на гидроксилирование терефталевой кислоты в тест-системе терефталевая кислота– Cu^{2+} – H_2O_2 (0.06/0.05/10.0 ммоль/л) время инкубирования которой перед регистрацией флуоресценции составляло 5 мин. За 100% принято образование 2-ГТФ в тест-системе без добавок АЦЦ^a

Количество N-ацетилцистеина, ммоль/л	Степень гидроксилирования, %	
	без добавок	с добавкой 0.1 ммоль/л аскорбата
0	100	100
0.017	115	106
0.025	118	108
0.05	120	107
0.075	122	107.5
0.1	151	81
0.5	99.5	59
1.0	98.5	44

ингибировали фрагментацию глицеро-2-фосфата концентрационно-зависимым способом.

Результаты, полученные с помощью флуоресцентного зонда (терефталевая кислота), подтверждают то, что N-ацетилцистеин способен усиливать потенциал редокс-системы Cu^{2+} – H_2O_2 продуцировать $\text{HO}^\bullet$. В тест-системе терефталевая кислота– Cu^{2+} – H_2O_2 при молярном соотношении N-ацетилцистеин: $\text{Cu}^{2+} \leq 2:1$ степень гидроксилирования терефталевой кислоты возрастает в сравнении с контролем (табл. 1) и начинает снижаться только при соотношении 10:1 и выше, что согласуется с нашими предыдущими данными [38].

В настоящей работе также было исследовано влияние N-ацетилцистеина на фрагментацию глицеро-2-фосфата в комбинации с аскорбиновой кислотой (витамин С), тролоксом и убихиноном Q_0 . Тролокс (ТхОН) является фенольным антиоксидантом, водорастворимым аналогом α -токоферола (витамин Е), в структуре которого боковая изопреноидная цепь во втором положении 2-метил-6-гидроксихроманола заменена на карбоксильную группу. Убихинон Q_0 , не содержащий в положении 6 *p*-бензохинонового кольца изопреновые звенья в отличие от коэнзима Q_{10} , представляет собой водорастворимый аналог данного

важнейшего компонента митохондриальной цепи переноса электронов.

На рис. 1б показаны данные по влиянию N-ацетилцистеина (2.5×10^{-4} – 1.0×10^{-2} моль/л) на фрагментацию глицеро-2-фосфата, индуцированную Cu^{2+} – H_2O_2 с добавкой 0.5 ммоль/л аскорбата (рН 7.0). Действие N-ацетилцистеина на Cu^{2+} -опосредованную фрагментацию в присутствии и в отсутствие аскорбата кардинально отличается. Надо отметить, что предварительное тестирование действия одного аскорбата показало, что он, как N-ацетилцистеин, интенсифицирует фрагментацию (рис. 1, I и I'). Это объясняется тем, что роль аскорбиновой кислоты ($\text{pK}_{\text{a}1}$ 4.1, $\text{pK}_{\text{a}2}$ 11.8, при рН 7.4 преимущественно моноанион AscH^-) в регуляции окислительного стресса двояка [15, 39]. Она может быть антиоксидантом, который эффективно взаимодействует с активных форм кислорода ($k_{\text{vho}} \cdot 1 \times 10^9$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$, рН 7.0 [39]), и прооксидантом, способствуя образованию активных форм кислорода в присутствии ионов переходных металлов. В реакции с Cu^{2+} аскорбат подвергается одноэлектронному окислению (схема 4) с образованием радикал-аниона ($\text{Asc}^{\bullet-}$), и, тем самым, способствует ре-циклизации $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ и, как следствие, интенсификации фрагментации глицеро-2-фосфата.

N-Ацетилцистеин в комбинации с аскорбатом обнаруживает инверсию эффекта с активирующего на протекторный. В присутствии аскорбата доля N-ацетилцистеина, участвующая в восстановлении Cu^{2+} , вероятно, снижается, и в большей степени проявляются его $\text{HO}^\bullet$ -акцепторные свойства. Это подтверждают результаты, полученные методом флуоресцентных зондов. N-Ацетилцистеин в комбинации с аскорбатом в меньшей степени интенсифицирует гидроксилирование терефталевой кислоты в тест-системе терефталевая кислота– Cu^{2+} – H_2O_2 , чем это делает индивидуально в том же концентрационном диапазоне (табл. 1). При этом его антирадикальная активность проявляется уже при молярном соотношении N-ацетилцистеин: $\text{Cu}^{2+} = 2:1$. Кроме того, аскорбат может способствовать регенерации N-ацетилцистеина путем восстановления его тиольных радикалов (схема 4) ($\text{GS}^\bullet k_{\text{v}} 5 \times 10^8$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$ [15]) до исходного тиола. Большой положительный эффект в модулировании карциногенеза и мутагенеза наблюдали при использовании комбинации N-ацетилцистеина с аскорбатом, чем каждого по отдельности [40].

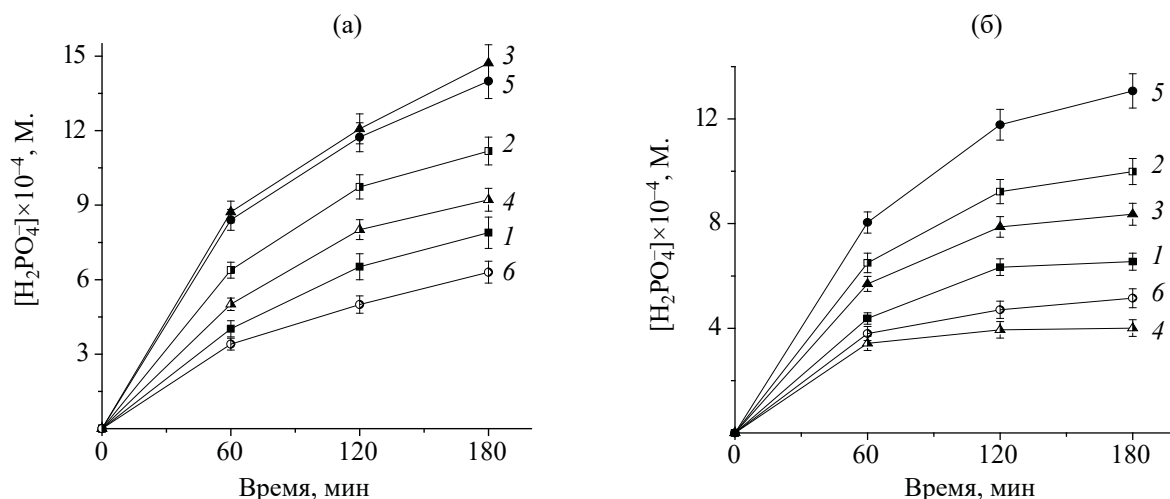


Рис. 3. Накопление H_2PO_4^- в водном растворе глицеро-2-фосфата ($c_{\text{ГФ}} 50 \times 10^{-3}$ моль/л), инкубированном с $\text{CuSO}_4\text{--H}_2\text{O}_2$ (0.25/15.0 ммоль/л) (а), $\text{FeSO}_4\text{--H}_2\text{O}_2$ (0.5/10.0 ммоль/л) (б) при 37°C без добавок (1), в присутствии 5.0 мМ N-ацетилцистеина (2, 3, 5), 0.5 ммоль/л тролокса (3, 4), 0.5 ммоль/л убихинона Q_0 (5, 6).

Результаты по влиянию N-ацетилцистеина на свободнорадикальную фрагментацию глицеро-2-фосфата в присутствии ТхОН и убихинона Q_0 представлены на рис. 3. Изучали влияние добавки (0.25–1.0 ммоль/л) ТхОН или Q_0 на активирующее действие N-ацетилцистеина, который он проявляет при концентрации 5 ммоль/л. ТхОН усиливает стимулирующее действие N-ацетилцистеина в случае $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ -опосредованной фрагментации и снижает при $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированном процессе. Q_0 проявляет аддитивность эффекта с N-ацетилцистеином в обоих случаях. При этом надо отметить, что индивидуально ТхОН активирует или ингибирует фрагментацию глицеро-2-фосфата в присутствии Cu^{2+} или Fe^{2+} соответственно, Q_0 действует как антиоксидант в обоих случаях (рис. 3). Ранее было выявлено [30, 41], что и ТхОН, и Q_0 ингибируют радиационно-иницированную фрагментацию биологически активных производных глицерина.

Антиоксидантная активность ТхОН (pK_a 3.89: $-\text{COOH}$, 11.92: $-\text{OH}$ [42]) связана с тем, что он способен отдавать водород из гидроксильной группы хроманольного кольца реакционноспособным частицам, трансформируясь при этом в относительно стабильный феноксильный радикал ТхО $\cdot$. Данный фенольный антиоксидант может дезактивировать $\text{HO}\cdot$ (ТхОН $k_{\text{HO}\cdot}$ $2.2\text{--}6.9 \times 10^9$ моль $^{-1}\cdot\text{л}\cdot\text{с}^{-1}$ [42]) и

восстанавливать первичные радикалы глицеро-фосфата $\text{RC}\cdot\text{H}(\text{OH})$ до $\text{RCH}_2(\text{OH})$ (схема 4). Таким образом, ТхОН будет способствовать снижению фрагментации и нивелировать активирующий эффект N-ацетилцистеина на Fe^{2+} -опосредованный процесс. Помимо этого, ТхОН может регенерировать N-ацетилцистеин, так как способен восстанавливать тиольные радикалы до исходного тиола (схема 4) ($k_v \sim 10^8$ моль $^{-1}\cdot\text{л}\cdot\text{с}^{-1}$, pH 7.0 [42]).

Активирующий эффект ТхОН и его аддитивность с таковым для N-ацетилцистеина обусловлен его взаимодействием с Cu^{2+} , которые фенол восстанавливает до Cu^+ , окисляясь при этом до хинона. В результате ТхОН способствует повышению уровня $\text{HO}\cdot$ и соответственно инициированию фрагментации глицеро-2-фосфата. Результаты, полученные методом флуоресцентных зондов, подтверждают данное предположение. При введении ТхОН (0.1–2.0 ммоль/л) в тест-систему терефталевая кислота– Cu^{2+} (0.06/0.05 ммоль/л) регистрировали флуоресценцию, что свидетельствует об образовании $\text{HO}\cdot$. Величина ее интенсивности возрастала с ростом концентрации ТхОН: 0.01 ммоль/л – 0.05, 0.1 ммоль/л – 0.112, 1.0 ммоль/л – 0.262, 2.0 ммоль/л – 0.921 (рассчитанная $k_{\text{SHO}\cdot}$ 1×10^9 моль $^{-1}\cdot\text{л}\cdot\text{с}^{-1}$). Радикалы $\text{HO}\cdot$ в смеси ТхОН– Cu^{2+} регистрировали методом спиновых ловушек [43]. Тролокс в комбинации с Cu^{2+}

усиливал образование активных форм кислорода в астроцитах [44] и окисление липопротеинов низкой плотности [45]. Стимулирующее действие ТхОН проявлял при индуцировании окисления белков системой $\text{Fe}^{3+}\text{--H}_2\text{O}_2$, но не оказывал такого сильного влияния на процесс, стимулированный $\text{Fe}^{2+}\text{--H}_2\text{O}_2$ [46], с чем согласуются полученные нами данные.

В работе [47] прослеживается корреляция между активирующим эффектом ТхОН и способностью радикалов $\text{TxO}^\bullet$ окислять HS-группы глутатиона (GSH). Методами импульсного радиолиза и ЭПР показано [42], что радикалы $\text{TxO}^\bullet$ могут восстанавливаться тиолами, но скорость такой реакции низкая ($k_v < 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$, pH 7.0), при этом важна высокая концентрация последних. Учитывая этот факт и наши данные по антиоксидантному действию ТхОН в присутствии Fe^{2+} , окисление сульфгидрильных групп N-ацетилцистеина радикалами $\text{TxO}^\bullet$, по всей видимости, не вносит существенного вклада в стимулирующий эффект ТхОН.

Убихинон Q_0 усиливает активирующий эффект N-ацетилцистеина как в Cu^{2+} , так и Fe^{2+} -содержащих системах, хотя самостоятельно ингибирует фрагментацию (рис. 3). Q_0 способен акцептировать $\text{HO}^\bullet$ (рассчитанная $k_{\text{SHO}^\bullet} \cdot 9 \times 10^9 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ согласуется с литературной $\sim 10^9 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ [20]) с образованием семихиноновых радикалов ($\text{Q}_0^\bullet$ или $\text{Q}_0\text{H}^\bullet$; рК семихинонового радикала 5.9 [48], 6.45 [49]), а также взаимодействовать с радикалами глицерофосфата $\text{RC}^\bullet\text{N}(\text{OH})$ и окислять их при этом до карбонильных соединений $\text{RC}(\text{O})\text{H}$ [30, 48], что будет препятствовать их реакции фрагментации. Образующиеся семихиноновые радикалы могут диспропорционировать с образованием убихинола Q_0H_2 .

Усиление промотирующего действия N-ацетилцистеина убихиноном скорее связано с его способностью спонтанно формировать S-конъюгированные аддукты с тиолами [50]. Известно, что хиноны могут взаимодействовать с тиолами с помощью различных механизмов, необратимо связывая SH-группы [51–54]. Среди гомологов кофермента CoQ_{10} убихинон Q_0 проявлял самую высокую токсичность и индуцировал гибель HeLa-клеток, что сопровождалось снижением количества сульфгидрильных групп [50]. Кроме того, образующийся убихинол Q_0H_2 может усиливать потенциал

$\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -редокс-циклов. Семихиноновые радикалы $\text{Q}_0^\bullet$ способны реагировать с H_2O_2 с образованием $\text{HO}^\bullet$ [55].

Таким образом, влияние N-ацетилцистеина на гомолитическое дефосфорилирование β -глицерофосфата, протекающее через стадию образования α -гидроксилсодержащих углерод-центрированных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{--HC}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2)\text{--C}^\bullet\text{H}(\text{OH})$, зависит от способа инициирования процесса. N-Ацетилцистеин оказывает радиопротекторный эффект на фрагментацию, индуцированную γ -излучением. Действие N-ацетилцистеина на $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ -опосредованную фрагментацию может быть как активирующим, так и ингибирующим, и зависит от вида иона металла M^{n+} , молярного соотношения N-ацетилцистеин– M^{n+} , а также присутствия биологически активных соединений, обладающих редокс-активными и радикал-акцепторными свойствами. Полученные результаты важны для понимания молекулярных механизмов действия N-ацетилцистеина в регуляции свободнорадикальных процессов в полярной части фосфолипидной мембраны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали N-ацетил-L-цистеин, L-метионин (Met), динатриевую соль глицеро-2-фосфата, терефталевую кислоту, 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту (тролокс, ТхОН), 2,3-диметокси-5-метил-*n*-бензохинон (убихинон или коэнзим Q_0) производства фирмы «Sigma-Aldrich» (Германия). Азид натрия, аскорбиновая кислота, пероксид водорода, соли металлов ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) были получены от ЗАО «Вектон» (Россия), а также фосфатно-солевой буфер (10 ммоль/л, pH 7.4).

Все использованные в работе реактивы имели аналитическую степень чистоты. Водные растворы готовили на деионизированной воде. Величину pH растворов контролировали, используя pH-метр Hanna HI 9321 с комбинированным электродом HI 1131 или HI 1083.

Методы инициирования свободнорадикальных процессов. Физическое инициирование с помощью γ -излучения осуществляли следующим образом. Исследуемые водные растворы глицеро-2-фосфата (pH 7.0) с добавками/без добавок, помещенные в стеклянные ампулы, продували

аргоном (99.9 %) в течение 60 мин, затем ампулы запаивали и облучали на γ -установке МРХ-гамма-25М с источником излучения ^{60}Co . Для определения мощности поглощенной дозы использовали ферросульфатный дозиметр Фрике ($G(\text{Fe}^{3+}) = 15.5$ частица/100 эВ). Мощность поглощенной дозы установки составляла (0.22 ± 0.01) Гр/с, интервал поглощенных доз – $(0 \div 1.6)$ кГр. Облучение образцов проводили при комнатной температуре (20 ± 2) °С. Радиационно-химические выходы рассчитывали из графика накопления H_2PO_4^- в зависимости от поглощенной дозы. Концентрация H_2PO_4^- увеличивалась линейно с увеличением дозы облучения.

Химическое инициирование свободнорадикальных процессов осуществляли с помощью редокс-систем $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})-\text{H}_2\text{O}_2$, генерирующих $\text{HO}^\bullet$. К растворам глицеро-2-фосфата (рН 7.0) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и H_2O_2 , конечная концентрация которых указана в подписях к рисункам. Порядок введения реагентов в раствор субстрата был следующим: N-ацетилцистеин, добавка биологически активного соединения, соль металла, пероксид водорода. Образцы тщательно перемешивали с использованием прибора Vortex mixer после добавления каждого реагента и далее термостатировали при 37°C в течение заданного времени.

Анализ неорганического фосфата в растворах глицерофосфата. Фосфат-анион в растворах глицеро-2-фосфата (рН 7.0) определяли фотоколориметрически по модифицированной методике, изложенной в [56]. В основе анализа использована цветная реакция фосфат-аниона с молибдатом аммония. Процедура анализа была следующая: к 0.2 мл исследуемой пробы добавляли 1 мл воды, 1 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (1.8%-ный раствор в 2 н. H_2SO_4) и 0.2 мл раствора FeSO_4 (10%-ный раствор в 0.15 н. H_2SO_4). Полученный раствор фотометрировали относительно холостой пробы при λ 720 нм на приборе Solar CM2203 в режиме «спектрофотометрия». Для получения градуировочного графика навески KH_2PO_4 растворяли в растворе глицерофосфата (c 25×10^{-3} моль/л). Концентрацию фосфат-аниона рассчитывали из уравнения линейной регрессии.

Определение антирадикальной активности соединений. Способность тестируемых соеди-

нений акцептировать или содействовать образованию радикалов $\text{HO}^\bullet$ в $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -содержащих системах оценивали с помощью молекулярного зонда, терефталевой кислоты. Терефталевая кислота, реагируя с $\text{HO}^\bullet$, образует только один продукт – 2-гидрокси-терефталат, обладающий флуоресценцией (λ_{ex} 315 нм, λ_{em} 418 нм) [57]. В соответствии со стехиометрией реакции, концентрация радикалов $\text{HO}^\bullet$ прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции 2-гидрокси-терефталата. Активность (0.01–3 ммоль/л) соединений в отношении $\text{HO}^\bullet$ оценивали по их влиянию на кинетику гидроксирования терефталевой кислоты. На основании этих данных рассчитывали величины относительных констант скоростей реакции соединений (S) с $\text{HO}^\bullet$ ($k_{S,\text{HO}^\bullet}$). Детальное изложение методики эксперимента представлено в нашей работе [35]. Спектры флуоресценции в диапазоне длин волн 350–550 нм получали на спектрофлуориметре Solar CM2203.

Статистический анализ. Для обработки полученных экспериментальных результатов применяли методы математической статистики, включая встроенные в компьютер статистические функции программы Excel и Origin. Достоверность полученных результатов контролировали с помощью t-теста Стьюдента. В каждой экспериментальной серии проводили 3–5 раз параллельных опытов. На рисунках каждый результат представлен как среднее значение $\pm \text{SD}$, статистически отличное в сравнении с контролем ($P < 0.05$).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках задания государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биорганическая химия» (проект № 2.2.03.04).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Šalamon Š., Kramar B., Marolt T.P., Poljšak B., Milisav I. // Antioxidants. 2019. Vol. 8. P. 111. doi 10.3390/antiox8050111

2. Tenório M.C.d.S., Graciliano N.G., Moura F.A., Oliveira A.C.M.d., Goulart M.O.F. // *Antioxidants*. 2021. Vol. 10. P. 967. doi 10.3390/antiox10060967
3. Aldini G., Altomare A., Baron G., Vistoli G., Carini M., Borsani L., Sergio F. // *Free Radic. Res.* 2018. Vol. 52. P. 751. doi 10.1080/10715762.2018.1468564
4. Zafarullah M., Li W.Q., Sylvester J., Ahmad M. // *Cell Mol. Life Sci.* 2003. Vol. 60. P. 6. doi 10.1007/s000180300001
5. Di Marco F., Foti G., Corsico A.G. // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2022. Vol. 26. P. 715. doi 10.26355/eurrev_202201_27898
6. De Flora S., Cesarone C.F., Balansky R.M., Albin A., D'Agostini F., Bennicelli C., Bagnasco M., Camoirano A., Scatolini L., Rovida A., Izzotti A. // *J. Cell. Biochem.* 1995. Vol. 22 (S22). P. 33. doi 10.1002/jcb.240590806
7. Kwon Y. // *Antioxidants*. 2021. Vol. 10. P. 169. doi 10.3390/antiox10020169
8. Azzi A. // *Antioxidants*. 2022. Vol. 11. P. 1431. doi 10.3390/antiox11081431
9. Oxidative Stress: Eustress and Distress / Ed. H. Sies. London: Academic Press, 2020. P. 3. doi 10.1016/b978-0-12-818606-0.00001-8
10. Samuni Y., Goldstein S., Dean O.M., Berk M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1830. P. 4117. doi 10.1016/j.bbagen.2013.04.016
11. Pedre B., Barayeu U., Ezeriņa D., Dick T.P. // *Pharmacol. Ther.* 2021. Vol. 228. P. 107916. doi 10.1016/j.pharmthera.2021.107
12. Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Капкаева М.Р., Зеленова Е.А., Исаев Н.К. // *Биохимия*. 2017. Т. 82. № 10. С. 1530; Stelmashook E.V., Genrikhs E.E., Kapkaeva M.R., Zelenova E.A., Isaev N.K. // *Biochem.* 2017. Vol. 82. P. 1176. doi 10.1134/S0006297917100108
13. Mlejnek P., Dolezel P., Kriegova E., Pastvova N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. P. 12635. doi 10.3390/ijms222312635
14. Sagrista M., Garcia A., De Madariaga M., Mora M. // *Free Radic. Res.* 2002. Vol. 36. P. 329. doi 10.1080/10715760290019354
15. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: University Press, 2012. 851 p.
16. Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuca K., Musilek K. // *Arch. Toxicol.* 2016. Vol. 90. P. 1. doi 10.1007/s00204-015-1579-5
17. Halliwell B., Adhikary A., Dingfelder M., Dizdaroglu M. // *Chem. Soc. Rev.* 2021. Vol. 50. P. 8355. doi 10.1039/D1CS00044F
18. Lenzen S., Lushchak V.I., Scholz F. // *Arch. Toxicol.* 2022. Vol. 96. P. 1915. doi 10.1007/s00204-022-03282-6
19. Parvez S., Long M.J.C., Poganik J.R., Aye Y. // *Chem. Rev.* 2018. Vol. 118. P. 8798. doi 10.1021/acs.chemrev.7b00698
20. Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B. // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 1988. Vol. 17. N 2. P. 513. doi 10.1063/1.555805
21. Martinez M., Hernandez A.I., Martinez N. // *Brain Res.* 2000. Vol. 855. P. 100.
22. Yajima D., Motani H., Hayakawa M., Sato Y., Sato K., Iwase H. // *Cell Biochem. Funct.* 2009. Vol. 27. P. 338. doi 10.1002/cbf.1578.
23. Юркова И.Л. // *Усп. хим.* 2012. Т. 81. № 2. С. 175; Yurkova I.L. // *Russ. Chem. Rev.* 2012. Vol. 81. N 2. P. 175. doi 10.1070/RC2012v081n02ABEH004205
24. Mailloux R.J. // *Antioxidants*. 2020. Vol. 9. P. 472. doi 10.3390/antiox9060472
25. Yurkova I., Arnhold J., Huster D. // *Chem. Phys. Lipids*. 2009. Vol. 158. N 1. P. 16. doi 10.1016/j.chemphyslip.2008.09.005
26. Yurkova I.L., Arnhold J., Fitzl G., Huster D. // *Chem. Phys. Lipids*. 2011. Vol. 164. P. 393. doi 10.1016/j.chemphyslip.2011.05.006
27. Olshuk V.N., Melsitova I.V., Yurkova I.L. // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. Vol. 177. P. 1. doi 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.010
28. Schuchmann M.N., Scholes M.L., Zegota H., von Sonntag C. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. Vol. 68. N 2. P. 121. doi 10.1080/09553009514551021
29. Кисель М.А., Шадыро О.И., Юркова И.Л. // *Химия высоких энергий*. 1997. Т. 31. № 2. С. 99; Kisel M.A., Shadyro O.I., Yurkova I.L. // *High Energy Chem.* 1997. Vol. 31. N 2. P. 80.
30. Потоцкая Т.В., Шадыро О.И., Юркова И.Л. // *Химия высоких энергий*. 2004. Т. 38. № 1. С. 4; Pototskaya T.A., Shadyro O.I., Yurkova I.L. // *High Energy Chem.* 2004. Vol. 38. N 1. P. 2.
31. Noszál B., Visky D., Kraszni M. // *J. Med. Chem.* 2000. Vol. 43. P. 2176. doi 10.1021/jm9909600
32. Winterbourn C.C., Metodiewa D. // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 27. P. 322. doi 10.1016/s0891-5849(99)00051-9
33. Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Мотякин М.В., Ионова И.С., Дегтярев Е.Н., Храмева Н.П. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2020. № 10. С. 1865; Zinatullina K.M., Kasaikina O.T., Motyakin M.V., Ionova I.S., Degtyarev E.N., Khrameeva N.P. // *Russ. Chem. Bull.* 2020. Vol. 69. N 10. P. 1865. doi 10.1007/s11172-020-2971-8
34. Зинатуллина К.М., Орехова А.В., Касаикина О.Т., Храмева Н.П., Березин М.П., Русина И.Ф. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2021. № 10. С. 1934; Zinatullina K.M., Orekhova A.V., Kasaikina O.T., Khrameeva N.P., Berezin M.P., Rusina I.F. // *Russ. Chem. Bull.* 2021. Vol. 70. N 10. P. 1934. doi 10.1007/s11172-021-3299-8
35. Шендикова Е.Н., Мельситова И.В., Юркова И.Л. // *Химия высоких энергий*. 2017. Т. 51. № 5. С. 380;

- Shendikova E.N., Mel'sitova I.V., Yurkova I.L.* // High Energy Chem. 2017. Vol. 51. N 5. P. 363.
36. *Schöneich C., Asmus K.-D., Bonifačić M.* // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1995. Vol. 91. P. 1923. doi 10.1039/ft9959101923
 37. *Murphy J.M.* Dissert. (Chem.), 2018. 207 p. https://tigerprints.clemson.edu/all_dissertations/2201
 38. *Милач О.А., Мельситова И.В., Юркова И.Л.* // ЖОХ. 2020. Т. 90. № 6. С. 888; *Milach O.A., Mel'sitova I.V., Yurkova I.L.* // Russ. J. Gen. Chem. 2020. Vol. 90. N 6. P. 987. doi 10.1134/S1070363220060080
 39. *Shen J., Griffiths P.T., Campbell S.J., Uttinger B., Kalberer M., Paulson S. E.* // Sci Rep. 2021. Vol. 11. P. 7417. doi 10.1038/s41598-021-86477-8
 40. *D'Agostini F., Balansky R.M., Camoirano A., de Flora S.* // Int. J. Cancer. 2000. Vol. 88. P. 702. doi 10.1002/1097-0215(20001201)88:5<702::aid-ijc4>3.0.co;2-3
 41. *Мельситова И.В., Юркова И.Л.* // Химия высоких энергий. 2015. Т. 49. № 3. С. 159; *Mel'sitova I.V., Yurkova I.L.* // High Energy Chem. 2015. Vol. 49. N 3. P. 133. doi 10.1134/S001814391503011X
 42. *Davies M.J., Forni L.G., Willson R.L.* // Biochem. J. 1988. Vol. 255. P. 513.
 43. *Burkitt M.J., Milne L.* // FEBS Lett. 1996. V. 379. P. 51.
 44. *Gyulkhandanyan A.V., Feeney C.J., Pennefather P.S.* // J. Neurochem. 2003. Vol. 87. P. 448. doi 10.1046/j.1471-4159.2003.02029.x
 45. *Albertini R., Abuja P.M.* // Free Rad. Res. 1999. Vol. 30. P. 181. doi 10.1080/10715769900300201
 46. *Lu N., Chen W., Peng Y.-Y.* // Eur. J. Pharmacol. 2011. Vol. 659. P. 95. doi 10.1016/j.ejphar.2011.03.009
 47. *Tafazoli S., Wright J.S., O'Brien P.J.* // Chem. Res. Toxicol. 2005. Vol. 18. P. 1567. doi 10.1021/tx0500575
 48. *James A.M., Smith R.A.J., Murphy M. P.* // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 423. P. 47. doi 10.1016/j.abb.2003.12.025
 49. *Land E.J., Swallow A.J.* // J. Biol. Chem. 1970. Vol. 245. P.1890. doi 10.1016/S0021-9258(18)63182-5
 50. *Takahashi T., Mine Y., Okamoto T.* // Biol. Pharm. Bull. 2018. Vol. 41. P. 1809. doi 10.1248/bpb.b18-00497
 51. *Takahashi N., Schreiber J., Fischer V., Mason R. P.* // Arch. Biochem. Biophys. 1987. Vol. 252. P. 41. doi 10.1016/0003-9861(87)90006-3
 52. *Кутырев А.А., Москва В.В.* // Усп. хим. 1991. Т. 60. С. 134; *Kutyrev A.A., Moskva V.V.* Russ. // Chem. Rev. 1991. Vol. 60. P. 72. doi 10.1070/RC1991v060n01ABEH001032
 53. *Thornton D. E., Jones K. H., Jiang Z., Zhang H., Liu G., Cornwell D. G.* // Free Rad. Biol. Med. 1995. Vol. 18. P. 963. doi 10.1016/0891-5849(94)00210-b
 54. *Варламов В.Т., Крисюк Б.Э., Григорьев В.Ю.* // Изв. АН. Сер. хим. 2018. № 10. С. 1851; *Varlamov V.T., Krisyuk B.E., Grigorev V.Y.* // Russ. Chem. Bull. 2018. Vol. 67. N 10. P. 1851. doi 10.1007/s11172-018-2298-x
 55. *Beyer R.E.* // Biochem. Cell Biol. 1992. Vol. 70. P. 390. doi 10.1139/o92-061
 56. *Gin F.J., Morales F.* // Anal. Biochem. 1977. Vol. 77. N 1. P. 10.
 57. *Page S.E., Arnold W.A., McNeill K.* // J. Environ. Monit. 2010. Vol. 9. N 12. P. 1658. doi 10.1039/c0em00160k

Effect of *N*-Acetylcysteine on $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ -Mediated Free Radical Fragmentation of Glycerophosphate in the Presence of Biologically Active Compounds

E. M. Ovsyannikova^a, I. O. Soloninkina^a, and I. L. Yurkova^{a,b,*}

^a Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

^b Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus
e-mail: yurkovail@tut.by

Received April 12, 2023; revised June 16, 2023; accepted June 22, 2023

The effect of *N*-acetylcysteine on homolytic fragmentation of β -glycerophosphate with cleavage of phosphoester bond was studied. It was shown that, *N*-acetylcysteine activates the fragmentation induced by $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})\text{-H}_2\text{O}_2$, and inhibits the radiation-induced process. The stimulated effect of *N*-acetylcysteine on $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ -mediated fragmentation in the presence of compounds affecting on $\text{HO}^\bullet$ level, the $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ ratio, or interacting with thiol is either enhanced (Trolox, Ubiquinone Q_0) or switched to a protective one (NaN_3 , Met, ascorbate). In the presence of Fe^{2+} Trolox unlike Q_0 reduces the promoter effect of *N*-acetylcysteine.

Keywords: *N*-acetylcysteine, glycerophosphate, free radical fragmentation, hydroxyl radical, trolox, ubiquinone Q_0