

УДК 54.04 + 54.06

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА, УСТОЙЧИВОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ ГЛУТАТИОНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

¹Фокина А.И., ¹Лялина Е.И., ¹Ашихмина Т.Я., ¹Жворонков В.И.,
²Петраш В.В., ¹Данилов Д.Н.

¹Вятский государственный гуманитарный университет, Киров, e-mail: annushka-fokina@mail.ru;

²Научно-исследовательский институт промышленной и морской медицины Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, e-mail: spbism@mail.ru

Представлены результаты экспериментального исследования состава и устойчивости медьсодержащих соединений глутатиона в анаэробных водных растворах методами потенциометрии, спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии, а также тестирования этих соединений тетразольно-топографическим и биолюминесцентным методами на культуре *Nostoc linckia* 273. Установлена область длин волн, в которой возможно зафиксировать образование комплексов меди и глутатиона; определены константы устойчивости комплексов меди с глутатионом различного состава. В ходе титрования соли меди глутатионом, при мольных соотношениях глутатиона с медью (II) 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и 1:6 в анаэробных условиях возникают резкие изменения измеряемых параметров: в потенциометрическом титровании увеличение dE/dV , а в инверсионно-вольтамперометрическом – уменьшение площади пика глутатиона, восстановленного на вольтамперограмме, что свидетельствует о том, что в данный момент образовалось какое-то соединение. В растворах, где на одну молекулу GSH приходится несколько ионов меди, таких изменений не происходит. Рассчитанные значения констант устойчивости свидетельствуют об образовании относительно термодинамически устойчивых комплексов. Выявлено, что глутатион способствует повышению биологической доступности меди (II), особенно в тех соединениях, где доля глутатиона выше.

Ключевые слова: глутатион, медьсодержащие соединения глутатиона, спектрофотометрия, инверсионная вольтамперометрия, потенциометрия, цианобактерии, биодоступность

THE RESEARCH OF COMPOSITION, STABILITY AND TOXICITY OF COPPER-BEARING COMPOUNDS OF GLUTATHIONE IN AQUEOUS SOLUTION

¹Fokina A.I., ¹Lyalina E.I., ¹Ashikhmina T.Y., ¹Zhavoronkov V.I.,
²Petrash V.V., ¹Danilov D.N.

¹Vyatka State University of Humanities, Kirov, e-mail: annushka-fokina@mail.ru;

²Research Institute of Industrial and Marine Medicine of the Federal medical-biological Agency, St. Petersburg, e-mail: spbism@mail.ru

The results of experimental research of composition, stability and toxicity of copper-bearing compounds of glutathione in aqueous anaerobic solutions by potentiometry, spectrophotometry and inversion voltammetry methods and the results of testing these compounds by tetrazole-topographic and bioluminescent methods on the culture *Nostoc linckia* 273 are presented in the article. The range of the wave's length in which it is possible to set the formation of complexes of copper and glutathione is established; the constant of stability of copper complexes with glutathione of different composition is defined. During titration glutathione copper salt, at a molar ratio of glutathione with copper (II) 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 and 1:6 under anaerobic conditions occur abrupt changes in the measured parameters: a potentiometric titration increase dE/dV , and inversion-voltamperometric reduction of the peak area of reduced glutathione on the voltammogram, which indicates that the currently formed a connection. In solutions, where one molecule of GSH have multiple copper ions such changes do not occur. The calculated values of the stability constants indicate the formation of a relatively thermodynamically stable complexes. Revealed that glutathione enhances the bioavailability of copper (II), especially in those compounds where the proportion of glutathione above.

Keywords: glutathione, glutathione copper compounds, spectrophotometry, inversion voltammetry, potentiometry, cyanobacteria, bioavailability

Исследование трансформации тяжелых металлов после их поступления в клетку является важной задачей экологической химии. Одним из агентов, принимающих участие в детоксикации поступающих поллютантов, является глутатион [5]. Постановка модельных экспериментов по изучению взаимодействия глутатиона с ионами меди(II), определению состава, устойчивости этих комплексов и их токсичности является актуальной задачей. Сложность изучения вза-

имодействия акваионов меди (II) с глутатионом заключается в том, что данный лиганд достаточно легко подвергается процессу окислительной димеризации, приводящей к образованию соответствующего продукта окисления со связью S–S, обладающего лигандными свойствами, в то время как ионы $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ обладают окислительными свойствами и могут превращаться в комплексные соединения Cu (I). В присутствии кислорода воздуха возможно окисление

Cu (I) и, как показано в литературе [13], образование продуктов активации молекулярного кислорода, в частности супероксид анион-радикала $O_2^{\cdot-}$. Это приводит к сложности однозначной интерпретации полученных экспериментальных данных. В частности, из-за этого отсутствуют систематизированные данные по исследованию состава, физико-химических свойств и токсичности комплексных соединений глутатиона с медью (II). Актуальность данного исследования определяется ролью глутатиона в живых организмах в процессе детоксикации соединений тяжёлых металлов и поддержания редокс-статуса клетки. Поэтому целью работы было исследование водных растворов с различным мольным соотношением сульфата меди (II) и глутатиона методами физико-химического и биологического анализов.

Материалы и методы исследования

Концентрации для приготовления исходных растворов выбирали с учётом растворимости образующихся соединений и рабочего интервала концентраций определяемых веществ на используемых приборах.

Образование комплексных соединений меди с глутатионом определяли методом потенциометрического и инверсионного вольтамперометрического титрования раствора сульфата меди (II) с концентрацией $1 \cdot 10^{-5}$ М раствором глутатиона с концентрацией 0,0005 М в анаэробных условиях (аргон). При потенциометрическом титровании регистрировали изменение э.д.с. на рН-метре-иономере «Эксперт-001» с медь-селективным электродом марки ЭЛИС-131, а при инверсионно-вольтамперометрическом титровании – площади пика глутатиона на вольтамперограммах, снятых на приборе «Экотест-ВА» с дисковым вращающимся электродом [7]. Методом

электронной спектроскопии поглощения, используя способ изомольных серий, исследовали растворы в соотношениях Cu(II):GSH равных 9:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:9 [1, 11]. Ультрафиолетовые спектры растворов снимали на однолучевом сканирующем спектрофотометре UNICO 2800 в интервале длин волн от 190 до 250 нм. При более высоких длинах волн ультрафиолета и в видимой части спектра пиков не наблюдали.

Три типа растворов, содержащих соль меди(II) в смеси с глутатионом в мольных соотношениях Cu(II):GSH, равных 1:0, 1:1 и 1:4 (содержание меди (II) во всех растворах одинаковое и равно $0,64 \text{ мг/дм}^3$), протестировали биолюминесцентным и тетразолюнотопографическим методами [2, 8] на культуре *Nostoc linckia 273* (титр = $9,5 \cdot 10^9 \text{ кл/см}^3$) из коллекции кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской государственной сельскохозяйственной академии. Почвенные цианобактерии *Nostoc linckia 273* перспективны для использования в качестве биотест-организмов при загрязнении окружающей среды соединениями тяжёлых металлов.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные, полученные методом спектрофотометрии, не дали сведений о составе соединений меди с глутатионом, но позволили выявить область соотношений, в которой наблюдается существование комплексов. Соединения начинают образовываться при мольном соотношении исходных веществ в смеси Cu:GSH, равном 2. При увеличении доли глутатиона доля оптической плотности, приходящейся на образующиеся соединения, возрастает и достигает максимума при соотношении 1:6. Область длин волн, в которой возможно зафиксировать образование комплексов лежит от 190 до 217 нм (рис. 1).

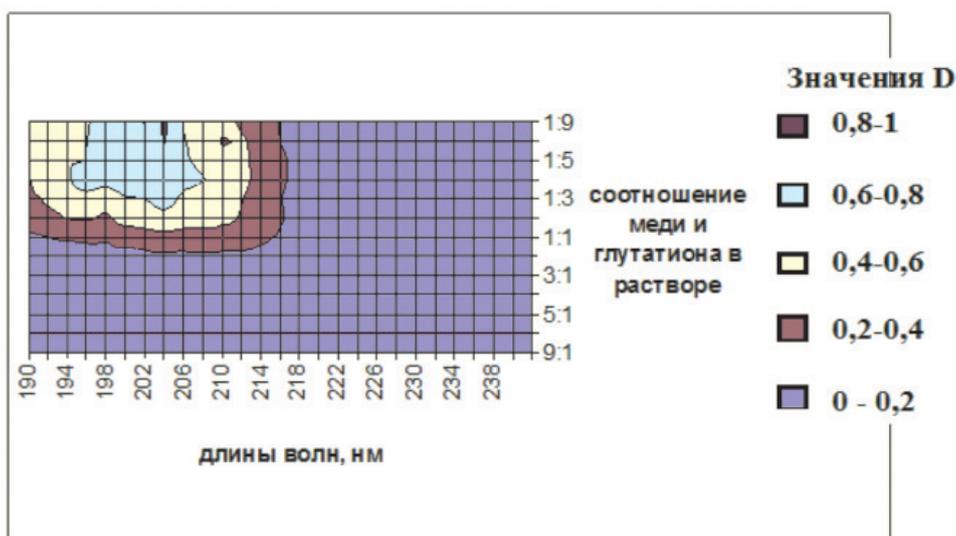


Рис. 1. Влияние состава растворов и длины волны на оптическую плотность раствора (график построен по данным, относящимся только к образующимся соединениям, и не учитывает оптическую плотность, обусловленную исходными соединениями)

Для подтверждения и уточнения данных, полученных методом спектрофотометрии, применены методы потенциометрического и инверсионно-вольтамперометрического титрования.

Данные, полученные этими двумя электрохимическими методами, подтвердили результаты спектрофотометрии относительно того, что в водном растворе при постепенном увеличении доли глутатиона первым образуется комплекс из раствора с мольным соотношением иона меди к лиганду, равным 1.

На графиках (рис. 2, 3) видно, что при прибавлении раствора глутатиона в количествах, создающих мольные соотношения с медью (II), равные 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и 1:6, возникают изменения измеряемых параметров. При потенциометрическом титровании наблюдается увеличение отношения dE/dV , а при инверсионно-вольтамперометрическом – уменьшение площади пика свободного глутатиона на вольтамперограмме, что свидетельствует об образовании соединения. В растворах, где на одну молекулу GSH приходится несколько ионов меди (II), таких изменений не обнаружено.

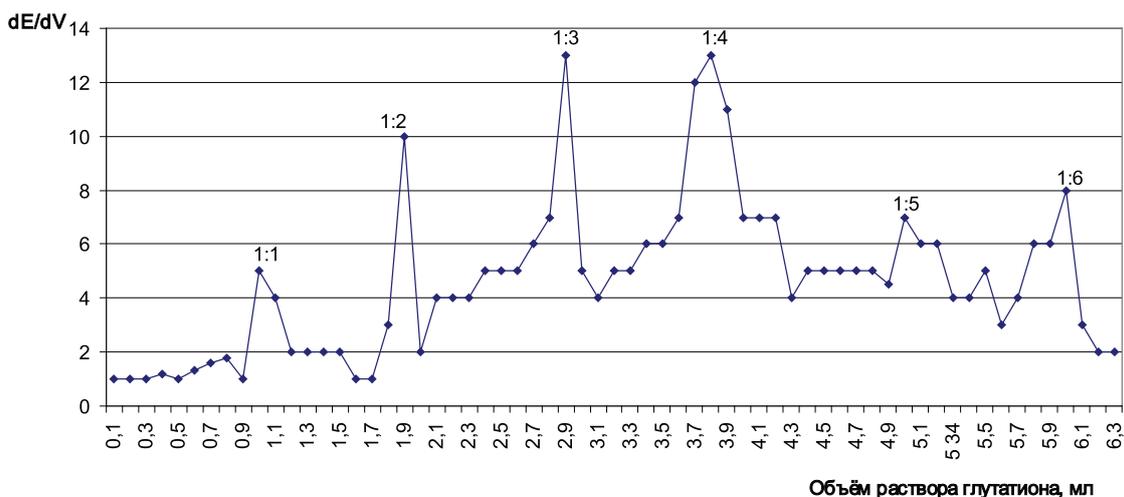


Рис. 2. Кривая потенциометрического титрования $1 \cdot 10^{-5}$ М раствора сульфата меди (II) $0,0005$ М раствором глутатиона

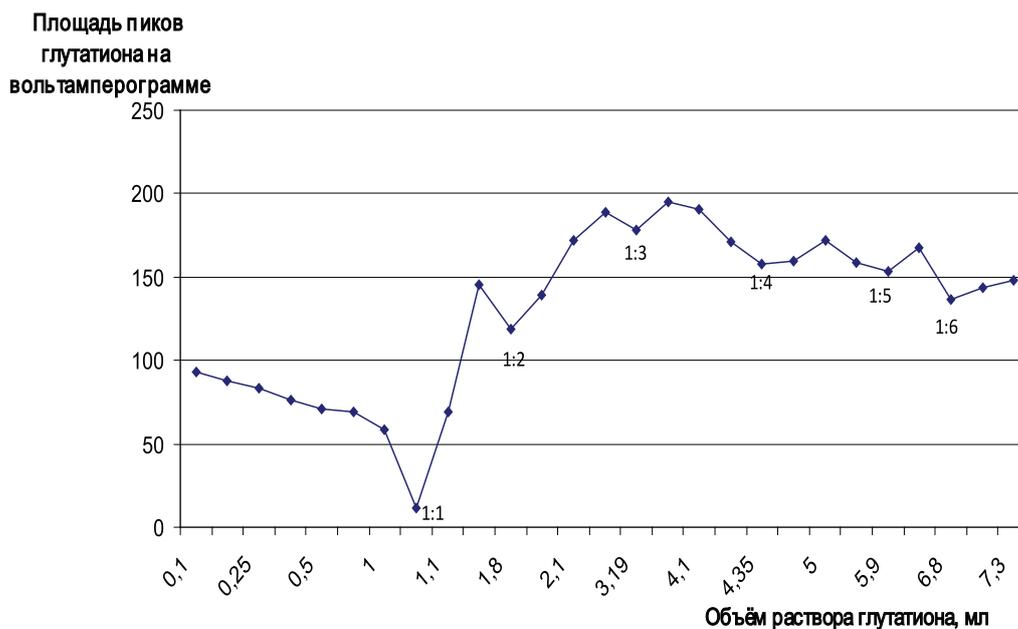


Рис. 3. Кривая инверсионно-вольтамперометрического титрования $1 \cdot 10^{-5}$ М раствора сульфата меди (II) $0,0005$ М раствором глутатиона

Литературные данные, свидетельствующие об обменном механизме реакции между медью (II) и глутатионом [4, 12], позволяют предположить, что выявленные изменения обусловлены ступенчатым образованием комплексных соединений между медью (II) и глутатионом. В этом случае по результатам потенциометри-

ческого и инверсионно-вольтамперометрического титрования можно рассчитать константы устойчивости медьсодержащих комплексов глутатиона различного состава (таблица). Согласно численным значениям констант данные соединения относятся к относительно термодинамически устойчивым комплексам.

Значения $\lg k$ комплексов меди с глутатионом различного состава

Мольное отношение Cu:GSH	Потенциометрия	ИВА
1:1	4,64 ± 0,05	6,21 ± 0,70
1:2	4,70 ± 0,05	3,90 ± 0,47
1:3	5,00 ± 0,05	4,72 ± 0,57
1:4	5,38 ± 0,06	5,34 ± 0,70
1:5	7,00 ± 0,07	6,02 ± 0,72
1:6	6,27 ± 0,07	6,30 ± 0,76

В растворе без глутатиона концентрация ионов меди 0,64 мг/дм³. При добавлении глутатиона до мольного соотношения с медью 1:1 исходная концентрация меди (II) уменьшается в два раза, а при добавлении пептида до соотношения 1:6 – уже в 60 раз. Соответственно, при увеличении доли глутатиона, должен уменьшаться обусловленный медью (II) токсический эффект.

Для выявления влияния глутатиона на токсичность соли меди (II), были протестированы растворы с мольными соотношениями Cu:GSH равными 1:0, 1:1 и 1:4 (рис. 4 и 5).

Достоверных различий между вариантами при исследовании тетразольно-топографическим методом не обнаружено, но есть

тенденция: с увеличением количества глутатиона в растворе уменьшается содержание формазана в клетках ЦБ, указывающее на увеличение токсичности (рис. 4). Данные, полученные в результате исследования биохемилюминесценции, показывают, что при увеличении содержания глутатиона увеличивается ИБХЛ культуры, что, скорее всего, также связано с усилением токсичности. Однако известно, что лиганд (глутатион) является важнейшим компонентом всех живых систем, и увеличение токсичности за его счёт маловероятно. Одна из функций глутатиона – защита организма от действия ТМ, а результаты исследований показывают увеличение токсичности с ростом его концентрации.

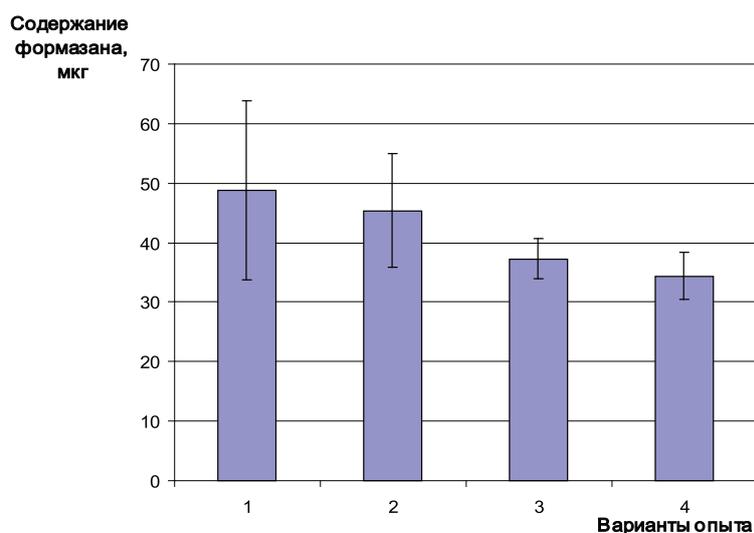


Рис. 4. Влияние соединений меди (II) на накопление формазана клетками цианобактерий *Nostoc linckia* 273:

1 – контроль (вода); 2 – Cu²⁺; 3 – Cu:GSH – 1:1; 4 – Cu:GSH – 1:4

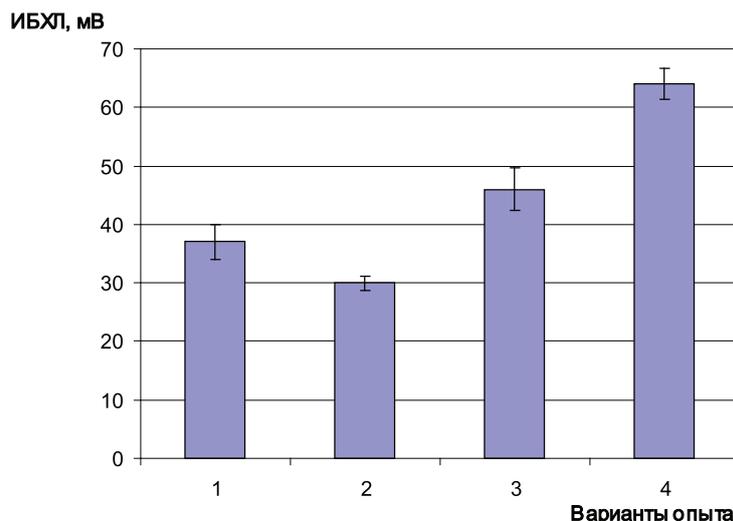


Рис. 5. Влияние соединений меди (II) на интенсивность биохемилюминесценции цианобактерий *Nostoc linckia* 273: 1 – контроль (вода); 2 – Cu^{2+} ; 3 – $\text{Cu}:\text{GSH} - 1:1$; 4 – $\text{Cu}:\text{GSH} - 1:4$

Анализ суспензии ЦБ показал, что с увеличением доли глутатиона в растворе появляется тенденция к увеличению содержания меди как в лиофобной, так и лиофильной фракциях клеток культуры, в большей степени в лиофильной (без глутатиона – 24 ± 8 мкг; 1:1 – 33 ± 11 мкг и 1:4 – 44 ± 14 мкг в лиофильной фракции; 74 ± 22 ; 77 ± 23 ; 96 ± 29 мкг соответственно в лиофобной фракции). Вероятнее всего, глутатион повышает биодоступность меди, и чем выше доля глутатиона в растворе, тем больше меди обнаружено в клетках. Соответственно, чем больше меди внутри клеток, тем токсичнее оказываются растворы согласно результатам тетразольно-топографического метода и тем интенсивнее биолюминесценция. Соединения меди с органическими лигандами усиливают биолюминесценцию за счет образования комплексов с кислородом и продуктами его активации [3, 10]. В частности, присоединение молекулярного кислорода к комплексам меди приводит, в зависимости от природы органического лиганда, к тому, что образуются соединения $\text{Cu}(\text{II})$ с супероксид анион-радикалом $\text{O}_2^{\cdot-}$ или соединения $\text{Cu}(\text{III})$ с пероксидным анионом O_2^{2-} [14]. Радикалы окисляют компоненты клетки, в ходе этих реакций выделяется энергия, обуславливающая увеличение люминесценции [6].

Выводы

1. Установлено, что при приливании раствора глутатиона мольных соотношениях с медью (II) 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и 1:6

в анаэробных условиях возникают резкие изменения измеряемых параметров: в потенциометрическом титровании увеличение dE/dV , а в инверсионно-вольтамперометрическом – уменьшение площади пика глутатиона восстановленного на вольтамперограмме, что свидетельствует о том, что в данный момент образовалось какое-то соединение. В растворах, где на одну молекулу GSH приходится несколько ионов меди, таких изменений не происходит. Рассчитанные значения констант устойчивости свидетельствуют об образовании относительно термодинамически устойчивых комплексов.

2. Выявлено, что глутатион способствует повышению биологической доступности меди (II), особенно в тех соединениях, где доля глутатиона выше.

3. Глутатион может обеспечивать в организме накопление соединений меди (II) и наоборот, недоступное для организма количество металла глутатион может сделать доступным.

4. Явление усиления биодоступности меди за счет образования комплексов с глутатионом следует учитывать при выборе тест-объектов при проведении биотестирования.

Список литературы

1. Алакаева Л.А. Спектрофотометрические методы исследования комплексных соединений: учебное пособие. – Нальчик, 2003. – 62 с.
2. Биоиндикаторы и биосистемы в оценке окружающей среды техногенных территорий / под ред. Т.Я. Ашихминой и Н.М. Алалыкиной. – Киров: О-Краткое, 2008. – 336 с.

3. Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 6. – С. 25–32.
4. Дорожко Е.В. Определение некоторых тиоловых соединений в биологических объектах методом инверсионной вольтамперометрии. Автореф. дисс. канд. хим. наук. – Томск, 2010. – 22 с.
5. Дорожко Е.В. Исследование электрохимических свойств глутатиона методом вольтамперометрии / Е.В. Дорожко, Е.И. Короткова // Химия и химическая технология. – 2010. – т. 53. – С. 35–38.
6. Корчагина М.В. Хемилюминесценция, сопряжённая с перекисным окислением липидов в биологических мембранах. Влияние глутатиона, цистеина и аскорбиновой кислоты / М.В. Корчагина, Ю.А. Владимиров // Биофизика. – Том XIX. – 1974. – С. 276–278.
7. Лялина Е.И. Некоторые особенности аналитического сигнала глутатиона получаемого методом инверсионной вольтамперометрии / Е.И. Лялина, А.И. Фокина, А.Н. Гудина [и др.] // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Материалы XI Всеросс. Науч.-практ. конф. – выставки инновационных экологических проектов с международным участием. – Киров, 2013. – С. 51–55.
8. Огородникова С.Ю. Методические подходы к количественному определению формазана в клетках цианобактерий / С.Ю. Огородникова, Л.И. Домрачева, Е.А. Горностаева [и др.] // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем: Материалы XI Всеросс. науч.-практ. конф. – выставки инновационных экологических проектов с международным участием. – Киров, 2013. – С. 48–51.
9. Сабиров В.Х. Структурнохимическое исследование комплексов переходных металлов с биологически активными органическими лигандами: автореф. дис. ... канд. хим. наук. – 1994.
10. Скурлатов Ю.И. Введение в экологическую химию / Ю.И. Скурлатов, Г.Г. Дука, А. Мизити. – М.: Высшая школа, 1994. – 400 с.
11. Фокина А.И. Исследование состава металлоорганических соединений – одна из важнейших задач экологии (на примере медьсодержащих соединений глутатиона / А.И. Фокина, Е.И. Лялина, С.Ю. Жижина [и др.] // Экология родного края: проблемы и пути их решения: материалы Всеросс. науч.-практ. конф. – Киров, 2014. – С. 310–313.
12. Chow S.T. Reactions of the tripeptide glutathione, with divalent cobalt, nickel, copper and palladium salts / S.T. Chow, C.A. McAuliffet, B.J. Sayle // J. inorg. nucl. Chem. – 1975 – Vol. 37. No. – P. 451–454.
13. Speisky H. Generation of superoxide radicals by copper–glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione / H. Speisky, M. Gomez, F. Burgos-Bravo, C. Lopez-Alarcon, C. Jullian, C. Olea-Azar, M.E. Aliaga // Bioorg. Med. Chem. – 2009. – Vol. 17. – № 5. – P. 1803–1810.
14. Sarangi, R. X-Ray Absorption edge spectroscopy and computational studies on LCuO₂ species: superoxide-CuII versus peroxide-CuIII bonding / R. Sarangi, N. Aboeella, K. Fujisawa, W.B. Tolman, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon // J. Am. Chem. Soc. 2008. – Vol. 128. – № 25. – P. 8286–8296.
3. Vladimirov Ju. A. Svechenie, doprovozhdajushhee biohimicheskie reakcii // Sorosovskij Obrazovatel'nyj Zhurnal. 1999. no. 6. S. 25-32.
4. Dorozhko E.V. Opredelenie nekotoryh tiolovyh soedinenij v biologicheskikh ob'ektah metodom inversionnoj vol'tamperometrii. Avtoref. diss. kand. him. nauk. Tomsk, 2010. 22 p.
5. Dorozhko E.V. Issledovanie jelektrohimicheskikh svojstv glutaciona metodom vol'tamperometrii / E.V. Dorozhko, E.I. Korotkova // Himija i himicheskaja tehnologija. 2010. tom 53. pp. 35–38.
6. Korchagina M.V. Hemiljuminescencija, soprjazhonnaja s perekisnym okisleniem lipidov v biologicheskikh membranah. Vlijanie glutaciona, cisteina i askorbinovoj kisloty / M.V. Korchagina, Ju.A. Vladimirov // Biofizika. Tom XIX. 1974. pp. 276–278.
7. Ljalina E.I. Nekotorye osobennosti analiticheskogo signala glutaciona poluchaemogo metodom inversionnoj vol'tamperometrii / E.I. Ljalina, A.I. Fokina, A.N. Gudina [i dr.] // Aktual'nye problemy regional'noj jekologii i biodiagnostika zhivyh sistem: Materialy XI Vseross. Nauch.-prakt. konf. vystavki innovacionnyh jekologicheskikh projektov s mezhdunarodnym uchastiem. Kirov, 2013. pp. 51–55.
8. Ogorodnikova S.Ju. Metodicheskie podhody k kolichestvennomu opredeleniju formazana v kletkah cianobakterij / S.Ju. Ogorodnikova, L.I. Domracheva, E.A. Gornostaeva [i dr.] // Aktual'nye problemy regional'noj jekologii i biodiagnostika zhivyh sistem: Materialy XI Vseross. Nauch.-prakt. konf. vystavki innovacionnyh jekologicheskikh projektov s mezhdunarodnym uchastiem. Kirov, 2013. pp. 48–51.
9. Sabirov V.H. Strukturnohimicheskoe issledovanie kompleksov perehodnyh metallov s biologicheskimi aktivnymi organicheskimi ligandami. Avtoref. dis. kand. him. nauk. 1994.
10. Skurlatov Ju.I. Vvedenie v jekologicheskiju himiju / Ju.I. Skurlatov, G.G. Duka, A. Miziti. M.: Vysshaja shkola, 1994. 400 p.
11. Fokina A.I. Issledovanie sostava metalloorganicheskikh soedinenij odna iz vazhnejshih zadach jekologii (na primere med'soderzhashchih soedinenij glutaciona / A.I. Fokina, E.I. Ljalina, S.Ju. Zhizhina [i dr.] // Jekologija rodnogo kraja: problemy i puti ih reshenija: Materialy Vseross. nauch.-prakt. konf. Kirov, 2014. pp. 310–313.
12. Chow S.T. Reactions of the tripeptide glutathione, with divalent cobalt, nickel, copper and palladium salts. / S.T. Chow, C.A. McAuliffet, B.J. Sayle // J. inorg. nucl. Chem. 1975 Vol. 37. No.pp. 451–454.
13. Speisky H. Generation of superoxide radicals by copper–glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione / H. Speisky, M. Gomez, F. Burgos-Bravo, C. Lopez-Alarcon, C. Jullian, C. Olea-Azar, M.E. Aliaga // Bioorg. Med. Chem. 2009. Vol. 17. no 5. pp. 1803–1810.
14. Sarangi R. X-Ray Absorption edge spectroscopy and computational studies on LCuO₂ species: superoxide-CuII versus peroxide-CuIII bonding / R. Sarangi, N. Aboeella, K. Fujisawa, W.B. Tolman, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 128. no 25. pp. 8286–8296.

References

1. Alakaeva L.A. Spektrofotometricheskie metody issledovaniya kompleksnyh soedinenij: uchebnoe posobie. Nač'chik, 2003. 62 p.
2. Bioindikatory i biosistemy v ocenke okruzhajushhej srede tehnogennyh territorij / Pod red. T.Ja. Ashihminoj i N.M. Alalykinoj. Kirov: O-Kratkoe, 2008. 336 p.

Рецензенты:

Алемасова А.С., д.х.н., профессор, заведующая кафедрой аналитической химии Донецкого национального университета Министерства образования и науки Украины, г. Донецк;

Воробьёв-Десятковский Н.В., д.х.н., профессор, начальник Управления ЗОА «Полиметалл Инжиниринг», г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 10.07.2014.