

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
РАСТВОРОВ

УДК: 544.43;577.164.16

МЕХАНИЗМЫ РЕАКЦИЙ КОБАЛАМИНОВ С ДИАЗЕНИУМДИОЛАТОМ
ДИЭТИЛАМИНА В НЕЙТРАЛЬНЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 2023 г. И. А. Деревеньков^{а,*}, Е. А. Черевина^а, С. В. Макаров^а

^аИвановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

*e-mail: derevenkov@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 30.06.2022 г.

Спектрофотометрическим методом и с использованием моделирования кинетических кривых в соответствии с предложенным механизмом в программе ChemMech изучены реакции аква-, метил-, циано-, сульфито-, глутатионилкобаламинов, кобаламина(II) и аквагидроксокобинамида с диазениумдиолатом диэтиламина (DEANONO) при pH 7.4, 25.0°C. Показано, что реакции метил-, циано- и сульфитокобаламинов с DEANONO не протекают. Реакция аквакобаламина с DEANONO не приводит к образованию нитрозилкобаламина (NOCbl) из-за относительно быстрого разложения DEANONO и медленного взаимодействия между исходными реагентами. Установлено, что глутатионилкобаламин превращается в NOCbl за счет взаимодействия с оксидом азота (II), выделяющимся при разложении DEANONO, и в ходе переноса нитроксила молекулы DEANONO на ион Co(III). Кобаламин(II) переходит в NOCbl за счет быстрого связывания NO, выделяющегося при разложении DEANONO. Показано, что реакция аквагидроксокобинамида с DEANONO включает быструю координацию DEANONO на ионе Co(III) и более медленный распад комплекса до нитрозилкобинамида и других продуктов.

Ключевые слова: витамин B₁₂, кобинамид, оксид азота (II), нитроксил, кинетика

DOI: 10.31857/S0044453723010053, **EDN:** BBLOCD

Кобаламины (Cbls) являются самыми распространенными в природе комплексами кобальта, принимающими участие в различных биологических процессах: биосинтезе метионина, изомеризации и деалогенировании органических субстратов и др. [1–4]. Наиболее важными биологическими формами кобаламинов являются метил-, аденозил-, аква-, сульфито- и глутатионилкобаламины [5]. Одноэлектронно восстановленный кобаламин (кобаламин(II), Cbl(II)) является одной из его биологических форм, которая образуется *in vivo* в ходе внутриклеточной переработки кобаламинов CblC-белком [6], взаимодействия аквакобаламина с различными восстановителями [7], гомолиза Co–C-связи в аденозилкобаламин-зависимых ферментах [2] и других реакциях. Cbl(II) обладает высокой реакционной способностью по отношению к оксиду азота (II), образуя при этом нитрозилкобаламин (NOCbl) [8]. Образование NOCbl протекает *in vivo* при инактивации метилмалонил-КоА-мутаза оксидом азота (II) [9]. Кроме того, NOCbl накапливается в результате взаимодействия Co(I)-формы Cbl, связанной с CblC-белком, с нитритом [10]. NOCbl образуется также в результате реакции аквакобаламина (H₂OCbl) с солью Анджели [11], кислотами Пилоти [12], глутатионилкобаламина с оксидом азота (II) [13] и Cbl(II) с нитрозотиолами [14].

NOCbl является продуктом реакции H₂OCbl с диазениумдиолатами (NONO-атами) [15]. NONO-аты в нейтральной и кислой средах обладают низкой стабильностью: в результате протонирования одна молекула NONO-ата выделяет две молекулы NO [16, 17]. Это объясняет их широкое применение в качестве доноров NO [18, 19]. Ранее реакция H₂OCbl с NONO-атами была изучена в щелочной среде [15]. Она протекает с низкой скоростью и включает перенос нитроксильного фрагмента (NO[–]) на ион Co(III) через промежуточное образование комплекса между Cbl(III) и NONO-атом. Неизвестно, однако, протекает ли реакция кобаламинов с NONO-атами при физиологическом значении pH. В настоящей работе исследовано взаимодействие H₂OCbl, метил-(MeCbl), циано-(CNCbl), сульфито-(SO₃Cbl), глутатионилкобаламинов (GSCbl), Cbl(II) и аквагидроксокобинамида (безнуклеотидного производного H₂OCbl; (H₂O)(HO[–])Cbi) с NONO-атом диэтиламина (DEANONO) при pH 7.4. (H₂O)(HO[–])Cbi является моделью base-off формы Cbl (формы с диссоциированным нуклеотидным фрагментом), которая образуется при связывании кобаламинов некоторыми белками (рис. 1) [1–3, 6].

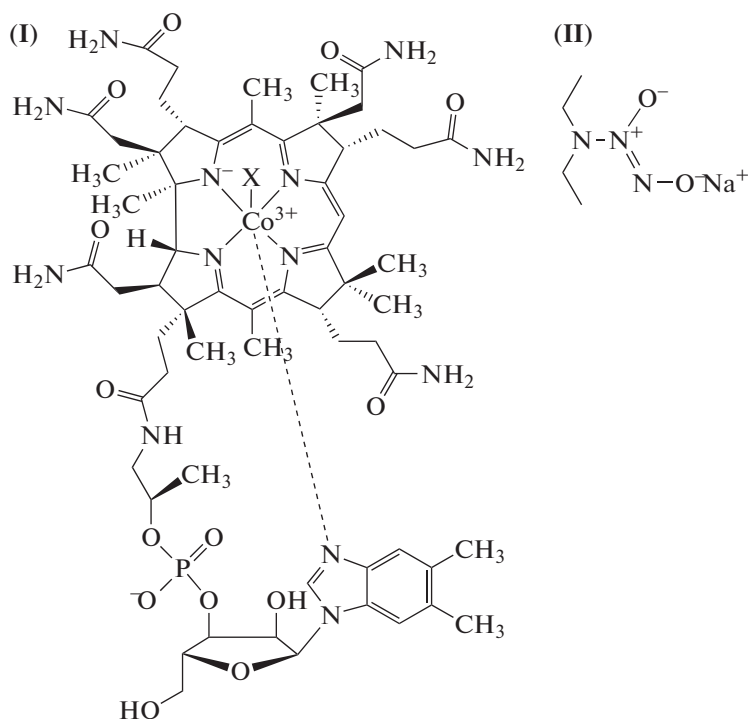


Рис. 1. Структурные формулы кобаламинов (I; X = H₂O, CH₃⁻, CN⁻ и др.) и натриевой соли NONO-ата диэтиламина (II).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гидроксокобаламин гидрохлорид (Sigma-Aldrich, ≥98%), CNCbl (J&K Scientific; 98%), MeCbl (J&K Scientific; 99%), натриевая соль DEANONO (Sigma-Aldrich; ≥97%), глутатион (GSH, J&K Scientific; 99%), сульфит натрия (Ленреактив; 99%) использовались без дополнительной очистки. Для создания анаэробных условий через растворы пропускали аргон. GSCbl, SO₃Cbl и Cbl(II) были синтезированы смешиванием в анаэробных условиях H₂OCbl с эквимольным количеством GSH, Na₂SO₃ и NaBH₄ соответственно; (H₂O)(HO⁻)Cbl был получен из CNCbl [20].

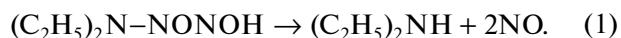
Для поддержания постоянного значения pH в ходе выполнения экспериментов использовался фосфатный буферный раствор (0.1 моль/л). Значения pH растворов определялись с помощью pH-метра Мультистест ИПЛ-103 (СЕМИКО), оснащенного электродом ЭСК-10601/7 (Измерительная техника). Электрод предварительно был откалиброван с использованием стандартных буферных растворов (pH 1.65–12.45).

Спектрофотометрические исследования выполнялись на термостатируемых (±0.1°C) спектрофотометрах Cary 50 и Shimadzu UV 1800 в герметичных кварцевых кюветах в анаэробных условиях при 25.0°C. Экспериментальные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Origin 9.1. Обработка кинетических кривых в соответствии с предложенной по-

следовательно стадий выполнялась с использованием программы ChemMech.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Добавление DEANONO к раствору H₂OCbl и последующая выдержка в течение 30 мин не приводит к изменениям в электронном спектре поглощения (ЭСП; рис. 2). При pH 7.4, 25.0°C для реакции разложения DEANONO (реакция 1) время полуреакции составляет $t_{1/2} = 10$ мин [21]. Таким образом, отсутствие изменений в ЭСП можно объяснить низкой скоростью реакции между DEANONO и H₂OCbl и быстрым разложением DEANONO. Отсутствие изменений в ЭСП наблюдалось и в случае добавления DEANONO к MeCbl, CNCbl и SO₃Cbl



Взаимодействие DEANONO с GSCbl приводит к убыли максимума при 560 нм и появлению пика при 484 нм в ЭСП (рис. 3), соответствующего NOCbl [8]. Известно, что GSCbl реагирует с NO с образованием NOCbl (2) [13]. Константа скорости для этой реакции составляет 2.8×10^3 л/(моль с) (pH 7.0) [13]. Кинетические кривые для реакции DEANONO с GSCbl показаны на рис. 4. Включение стадий (1) и (2) в модель для обработки кинетических кривых (рис. 4) не приводило к удовлетворительной обработке экспериментальных данных: коэффициент корреляции составлял 0.917, а среднеквадратичное отклонение

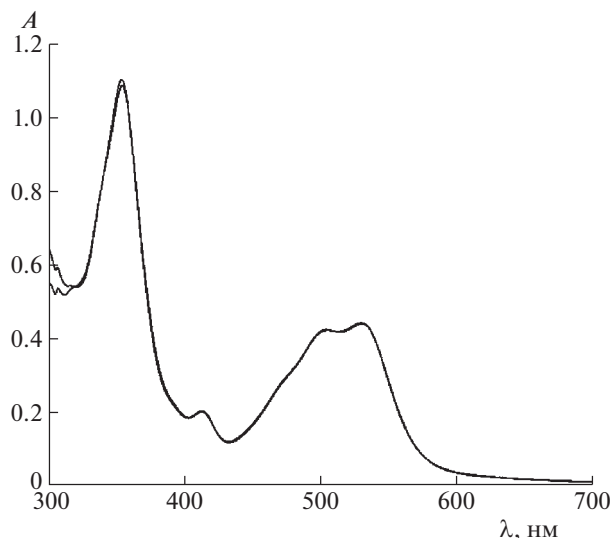


Рис. 2. Электронные спектры поглощения, записанные для смеси H_2OCbl (5.0×10^{-5} моль/л) с DEANONO (1.0×10^{-3} моль/л) в течение 30 мин при pH 7.4, 25.0°C.

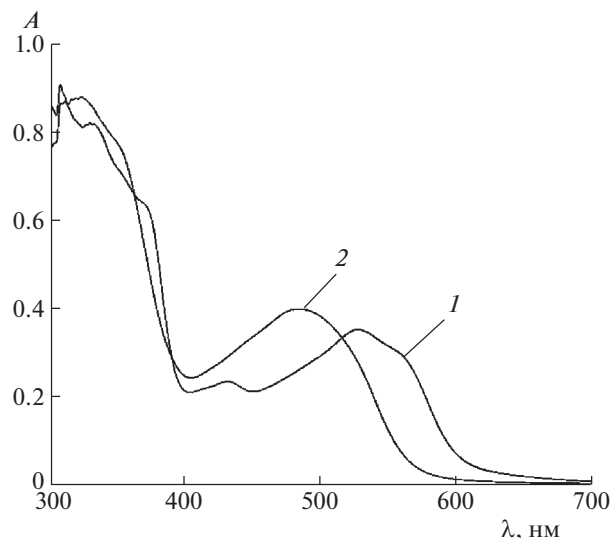
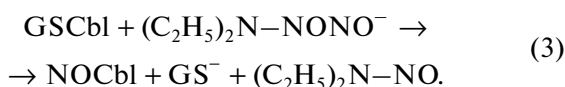


Рис. 3. Электронные спектры поглощения: 1 – GSCbl (5.0×10^{-5} моль/л) и 2 – продукта его реакции с DEANONO (5.0×10^{-4} моль/л) при pH 7.4, 25.0°C.

– 0.116. Улучшение обработки кинетических кривых было достигнуто включением в модель стадии (3), помимо стадий (1) и (2). В этом случае коэффициент корреляции равен 0.998, а среднеквадратичное отклонение – 0.017. Определена константа скорости для стадии (3): $k = (30 \pm 1)$ л/(моль с) (pH 7.4, 25.0°C). Таким образом, GSCbl способен реагировать не только с NO, но и с DEANONO, в результате чего происходит перенос нитроксила (NO^-) на ион Co(III) , что ранее было отмечено для реакции H_2OCbl с NONO-атами в щелочной среде [15]



Изучена реакция Cbl(II) с DEANONO. В этом случае взаимодействие приводит к убыли пиков при 312 и 475 нм, а ЭСП продукта соответствует NOCbl (рис. 5). Форма кинетических кривых близка к линейной (рис. 6), что можно объяснить медленным разложением DEANONO (1) и значительно более быстрым связыванием выделяющегося NO кобаламином(II) (4); $k = 7.4 \times 10^8$ л/(моль с) при pH 7.4, 25.0°C [8]. Наличие стадий (1) и



в механизме реакции Cbl(II) с DEANONO подтверждено также хорошим соответствием экспериментальных данных кривым, полученным в результате обработки кинетических кривых в программе Chem-Mech (рис. 6): коэффициент корреляции составляет 0.999, а среднеквадратичное отклонение – 0.016.

Установлено, что реакция $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ с DEANONO сопровождается появлением в ЭСП

максимума при 466 нм, соответствующего нитрозилкобалинамиду (NOCbi ; рис. 7) [22]. Продукт реакции также включает слабовыраженные максимумы при 349 и 500–530 нм, соответствующие исходному $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$, что можно объяснить неполным превращением $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ в NOCbi из-за разложения DEANONO в ходе реакции

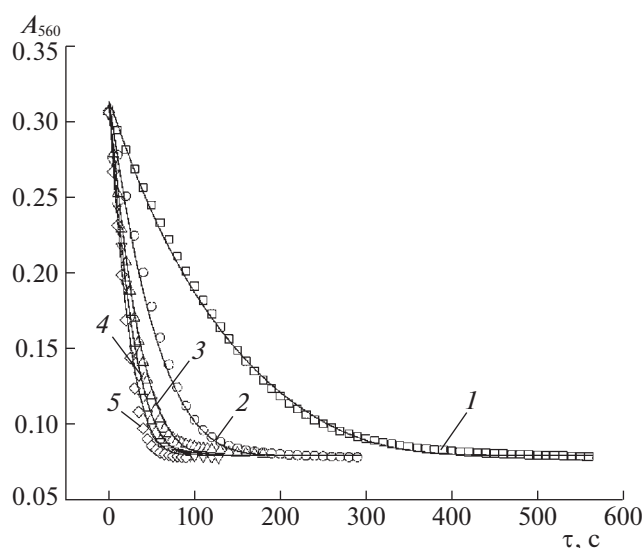
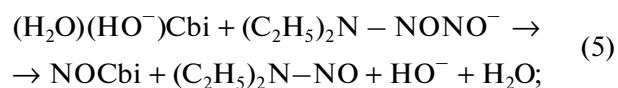


Рис. 4. Кинетические кривые реакции GSCbl (5.0×10^{-5} моль/л) с DEANONO (1 – 2.0, 2 – 5.0, 3 – 8.0, 4 – 1.0, 5 – 1.2×10^{-4} моль/л) при pH 7.4, 25.0°C.

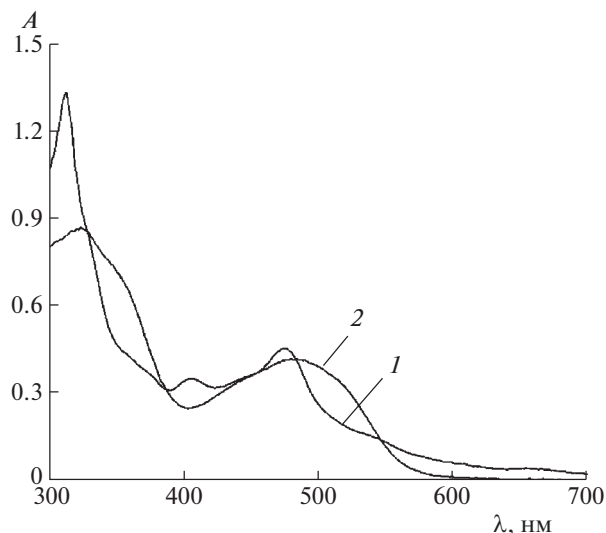
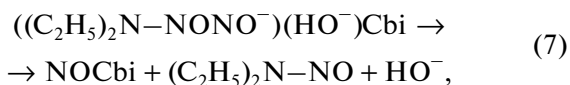
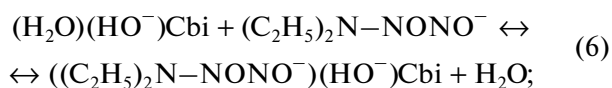


Рис. 5. Электронные спектры поглощения: 1 – Cbl(II) (5.0×10^{-5} моль/л) и 2 – продукта его реакции с DEANONO (4.0×10^{-4} моль/л) при pH 7.4, 25.0°C.



$$k' = \frac{k_{\text{dec}}K}{1 + [\text{DEANONO}]_0 K}. \quad (8)$$

Пример кинетической кривой реакции $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ с DEANONO приведен на рис. 8. Для обработки кинетических кривых в модель реакции были включены стадии (1) и (5). В этом случае коэффициент корреляции равен 0.999, а среднеквадратичное отклонение – 0.015. В результате обработки для реакции (5) были получены константы скорости (k'), значение которых зависит от начальной концентрации DEANONO (рис. 9). Форму зависимости k' от $[\text{DEANONO}]_0$ можно объяснить протеканием реакции (5) через стадии быстрого образования комплекса между $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ и DEANONO (6) и его более медленного распада до NOCbi и других продуктов (7). Зависимость k' от $[\text{DEANONO}]_0$ можно описать уравнением (8), где K – константа равновесия для реакции (6), л/моль, k_{dec} – константа скорости для реакции (7), 1/с. В результате обработки зависимости, представленной на рис. 9, уравнением (8) получены значения $K = (1.5 \pm 0.1) \times 10^3$ л/моль и $k_{\text{dec}} = (9.2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ с $^{-1}$ (25.0°C, pH 7.4).

Таким образом, в работе установлено, что метил-, циано- и сульфитокобаламины не взаимодействуют с NONO-атом диэтиламина при pH

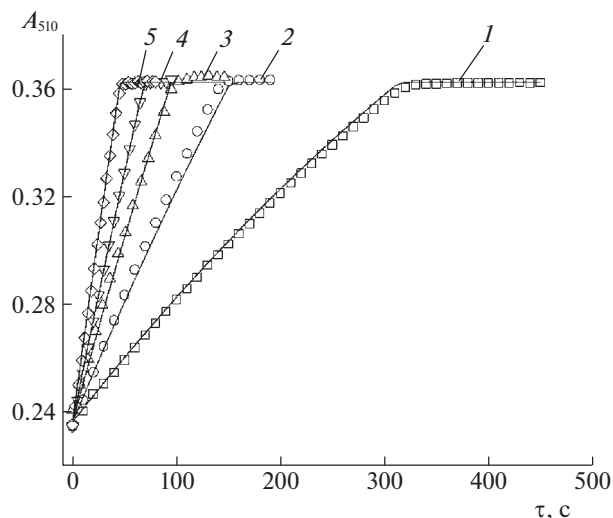


Рис. 6. Кинетические кривые реакции Cbl(II) (5.0×10^{-5} моль/л) с DEANONO (1 – 0.7, 2 – 1.3, 3 – 2.0, 4 – 2.7, 5 – 4.0 моль/л $\times 10^4$) при pH 7.4, 25.0°C. Экспериментальные данные и результат их обработки программой ChemMech показаны символами и линиями соответственно.

7.4, 25.0°C. В случае аквакобаламина реакция при pH 7.4 также не приводит к образованию нитрозилкобаламина, что объясняется быстрым распадом DEANONO и низкой скоростью реакции между H_2OCbi и DEANONO. Реакции глутатионилкобаламина, кобаламина(II) и аквагидроксокобинамида с DEANONO приводят к образованию соответствующих нитрозильных комплексов. В случае глутатионилкобаламина процесс

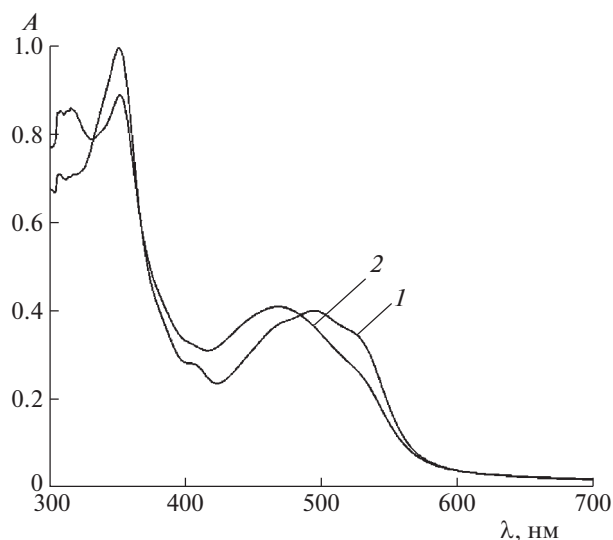


Рис. 7. Электронные спектры поглощения $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ (5.0×10^{-5} моль/л) после смешивания с DEANONO (2.0×10^{-3} моль/л; 1) и продукта этой реакции (2) при pH 7.4, 25.0°C.

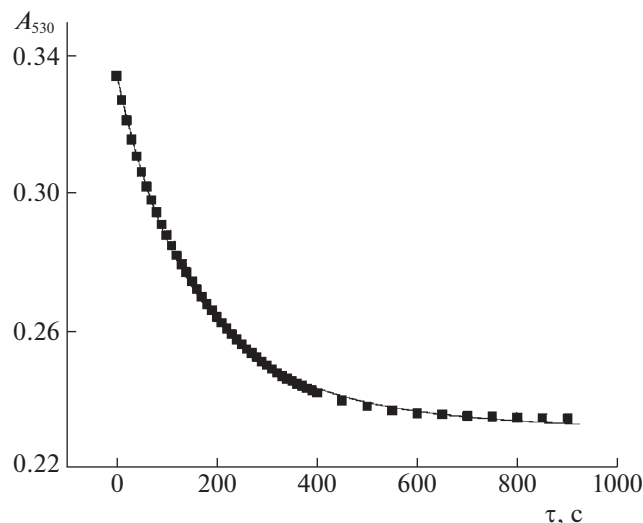


Рис. 8. Кинетическая кривая реакции $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ (5.0×10^{-5} моль/л) с DEANONO (2.0×10^{-3} моль/л) при pH 7.4, 25.0°C (символы) и результат ее обработки программой ChemMech (линия). Экспериментальные данные и результат их обработки программой ChemMech показаны символами и линиями соответственно.

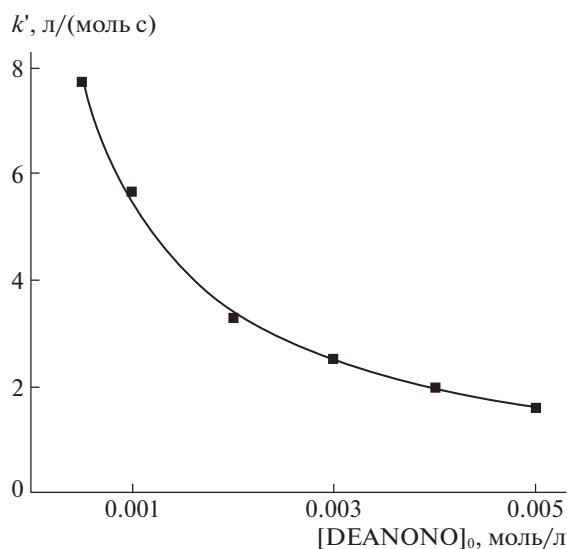


Рис. 9. Зависимость констант скорости, полученных в результате обработки кинетических кривых реакции между $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ и DEANONO программой ChemMech, (k') от начальной концентрации DEANONO при pH 7.4, 25.0°C (точки) и ее обработка уравнением (8) (линия).

протекает по двум параллельным маршрутам: через (i) взаимодействие GSCbi с NO, выделяющимся в результате разложения DEANONO, и (ii) перенос нитроксильного фрагмента с DEANONO на ион Co(III). Процесс с участием Cbi(II) включает связывание NO, выделяющегося в ходе

разложения DEANONO. Реакция между $(\text{H}_2\text{O})(\text{HO}^-)\text{Cbi}$ и DEANONO протекает через быструю координацию DEANONO на ионе Co(III) и последующий более медленный распад комплекса до NOCbi и других продуктов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-73-10057; <https://rscf.ru/project/21-73-10057/>). Исследование проведено с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИГХТУ (при поддержке Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-671).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kräutler B. // Biochem. Soc. Trans. 2005. V. 33. P. 806.
2. Brown K.L. // Chem. Rev. 2005. V. 105. P. 2075.
3. Bridwell-Rabb J., Grell T.A.J., Drennan C.L. // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. P. 555.
4. Bridwell-Rabb J., Drennan C.L. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2017. V. 37. P. 63.
5. Hannibal L., Axhemi A., Glushchenko A.V. et al. // Clin. Chem. Lab. Med. 2008. V. 46. P. 1739.
6. Gherasim C., Lofgren M., Banerjee R. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 13186.
7. Dereven'kov I.A., Salnikov D.S., Silaghi-Dumitrescu R. et al. // Coord. Chem. Rev. 2016. V. 309. P. 68.
8. Wolak M., Zahl A., Schnepfensieper T. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 9780.
9. Kambo A., Sharma V.S., Casteel D.E. et al. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 10073.
10. Mascarenhas R., Li Z., Gherasim C. et al. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 9630.
11. Polaczek J., Subedi H., Orzeł Ł. et al. // Inorg. Chem. 2021. V. 60. P. 2964.
12. Subedi H., Hassanin H.A., Brasch N.E. // Inorg. Chem. 2014. V. 53. P. 1570.
13. Zheng D., Birke R.L. // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. P. 9066.
14. Wolak M., Stochel G., van Eldik R. // Inorg. Chem. 2006. V. 45. P. 1367.
15. Hassanin H.A., Hannibal L., Jacobsen D.W. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. V. 48. P. 8909.
16. Shaikh N., Valiev M., Lyman S.V. // J. Inorg. Biochem. 2014. V. 141. P. 28.
17. Bobko A.A., Khramtsov V.V. // Nitric Oxide 2014. V. 40. P. 92.
18. Keefer L.K., Nims R.W., Davies K.M., Wink D.A. // Meth. Enzymol. 1996. V. 268. P. 281.
19. Fitzhugh A.L., Keefer L.K. // Free Radic. Biol. Med. 2000. V. 28. P. 1463.
20. Dereven'kov I.A., Osokin V.S., Molodtsov P.A. et al. // React. Kinet. Mech. Catal. 2022. V. 135. P. 1469.
21. Li Q., Lancaster J.R. Jr. // Nitric Oxide 2009. V. 21. P. 69.
22. Sharma V.S., Pilz R.B., Boss G.R., Magde D. // Biochemistry 2003. V. 42. P. 8900.