ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS

Հատոր Том Volume 120 2020 № 3

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 541.128: 661.719.3

З. О. Манукян, Л. А. Арутюнян, С. Г. Минасян, академик Л. А. Тавадян

Влияние витамина B12 на реакцию окисления метиллинолеата в мицелярных растворах

(Представлено 12/VIII 2020)

Ключевые слова: *B12, цианокобаламин, гидроксокобаламин, метилкобаламин, аденозилкобаламин, пероксидное окисление метиллинолеата, антирадикальная активность.*

Витамин B12 – это совокупность четырех форм химических разновидностей кобаламина – цианокобаламина, гидроксокобаламина, метилкобаламина и аденозилкобаламина (рис 1.) [1-3].

Кобаламины (Cbl) являются многофункциональными кобальтовыми комплексами нуклеотида 5,6-диметилбензимидазола и макроциклической корриновой системы. В центре корринового кольца располагается ион кобальта. Ион кобальта образует координационные связи с атомами азота трех пирролиновых циклов и ковалентную связь с четвертым атомом азота пирролидинового кольца. Еще одной ковалентной связью ион кобальта связан с диметилбензимидазольным нуклеотидом. Последняя, шестая, координационная связь кобальта остается относительно вакантной. По этой связи и присоединяются соответствующие функциональные группы: циано, гидроксильная, метильная или аденозильная (рис. 1). Центральный атом кобальта находится в высшей степени окисления Co(III) [2, 4, 5].

В живых клетках кобаламины находятся в двух формах – неактивной и активной (коферментной). Метилкобаламин и аденозилкобаламин – активные формы витамина B12, выступают в качестве кофакторов двух ферментов – метилмалонил-КоА мутазы митохондрий и метионинсинтазы. Неактивными же исходными формами являются цианокобаламин и гидроксокобаламин [2, 6].

Благодаря связи Co-C в структуре витамина B12 кобаламины проявляют каталитические свойства в процессах биоорганического синтеза. Восстановительно-окислительная и, соответсвенно, каталитическая активность кобаламинов зависит от величины заряда и координационного числа иона кобальта, которая напрямую определяет величину окислительно-вос-

становительных потенциалов и возможность редокс переходов пар Co(III)/Co(II) и Co(II)/Co(I) в биоорганических реакциях [4].

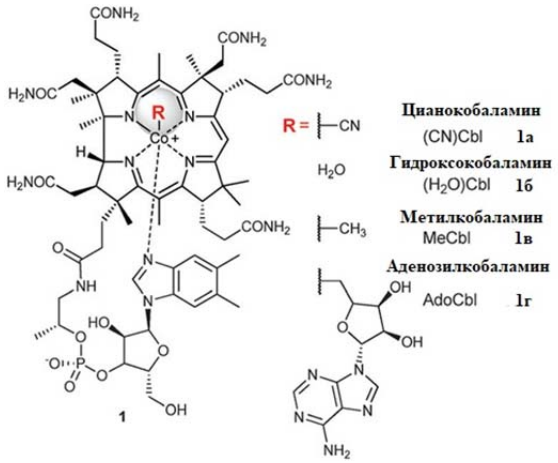

Рис. 1. Молекулярные структуры кобаламинов: цианокобаламин (1а), гидроксокобаламин (1б), метилкобаламин (1в) и аденозилкобаламин (1г).

Химия кобаламинов как антиоксидантов привлекает особый интерес в связи с их способностью защищать ДНК и липиды клеток от окислительных повреждений [7-9]. Кобаламины обладают способностью предотвращать окислительную деструкцию крови человека. Им отводится способность нейтрализовывать, «захватывать» свободные радикалы, которые способны изменять свойства биологических мембран, атаковать другие жизненно важные мишени клеток, влиять на функциональное состояние клеток и тем самым вызывать патологические состояния, так называемый окислительный стресс [10-12].

Исследование антиоксидантных свойств кобаламинов в реакциях окисления метиллинолеата в мицелярных растворах является актуальной задачей с точки зрения понимания их влияния на процесс пероксидного окисления липидов клеточных мембран [13]. Цепное окисление метиллинолеата в мицелярных растворах используется как кинетическая модель биологического процесса пероксидного окисления липидов [14, 15]. Посредством таких систем изучаются реакционные способности антиоксидантов, механизм действия которых в основном определяется их взаимодействием с носителями цепей – пероксильными радикалами (схема 1).

В связи с этим для выявления антиоксидантных свойств кобаламинов в настоящей работе была поставлена цель исследовать способность кобаламинов ингибировать цепные реакции пероксидного окисления в липидных модельных системах. Одновременно ставилась цель изучить взаимосвязи между молекулярным строением исследуемых кобаламинов и их антирадикальными, антиоксидантными и прооксидантными свойствами. Полученные результаты представляют важную информацию для выявления химических механизмов взаимодействия кобаламинов с пер-

оксильными радикалами, которые играют существенную роль в процессе окислительного стресса в организме.

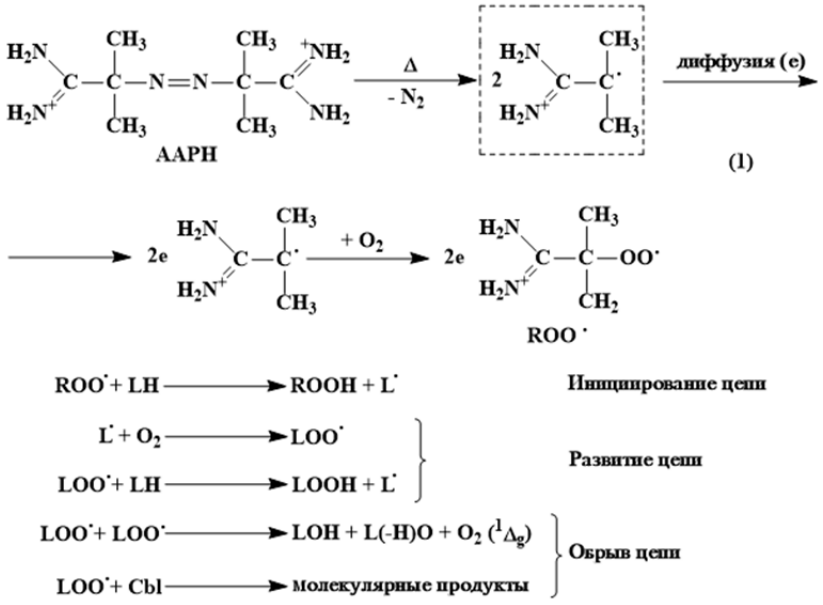

Схема 1. Кинетическая схема цепного окисления метиллинолеата (LH) молекулярным кислородом в присутствии кобаламинов.

Реактивы. Цианокобаламин, гидроксокобаламин, метилкобаламин, аденозилкобаламин, 2,2'-азо-бис (2–амидинопропан) гидрохлорид (AAPH), метиллинолеат, Triton X-100, физиологический раствор (0.9%-ный водный раствор хлорида натрия (NaCl)), фосфатный буфер (0.1M, pH=7.4) (NaH_2PO_4, Na_2HPO_4) приобретены от химических компаний Sigma-Aldrich и Cayman Chemicals (США). В экспериментах использовалась деионизированная вода с электрическим сопротивлением ≥16.2 МОм×см при 25^0C (H_2 Economy, LLC, PA).

Исследование кинетики цепного окисления метиллинолеата в мицелярных водных растворах. Исследования цепной свободнорадикальной реакции окисления метиллинолеата молекулярным кислородом проводились с помощью кислородного биологического монитора (Biological Oxygen Monitor System YSI 5300A, США).

Кинетика пероксидного окисления метиллинолеата в присутствии кобаламинов изучена посредством регистрации кинетических кривых поглощения молекулярного кислорода в процессе реакции. В качестве мицелярной реакционной системы использовались система, включающая метиллинолеат, Triton X-100/фосфатный буфер, молекулярный кислород. Раствор Triton X-100 в фосфатном буфере готовился в ультразвуковом приборе в течение 8 мин. Смесь Triton X-100 и метиллинолеата сначала насыщалась аргоном в течение 30 мин, а потом кислородом в течение 5 мин в условиях перемешивания реакционной смеси в реакционной ячейке,

термостатированной при температуре 37±0.1^{0}C. После этого в реакционную смесь последовательно добавлялись раствор термического азоинициатора (ААРН) и раствор соответствующего исследуемого кобаламина. Конечный объём реакционной смеси составлял 3 мл. Во время измерений реакциионная смесь перемешивалась с помощью магнитной мешалки.

Инициирование реакции пероксидного окисления метиллинолеата осуществлялось генерированием пероксильных радикалов путем термического распада ААРН при температуре 37±0.1^{0}C (схема 1).

Результаты и их обсуждение. На рис. 2 и 3 приведены типичные кинетические кривые поглощения кислорода в процессе окисления метиллинолеата при разных концентрациях цианокобаламина и метилкобаламина, соответственно.

Как следует из данных, приведенных на рис. 2, при добавлении цианокобаламина в реакционную смесь наблюдается уменьшение средней скорости поглощения кислорода по сравнению с реакцией в отсутствие цианокобаламина. Это свидетельствует о том, что цианокобаламин проявляет антиоксидантные свойства. Аналогичный эффект проявляется и для гидроксокобаламина.

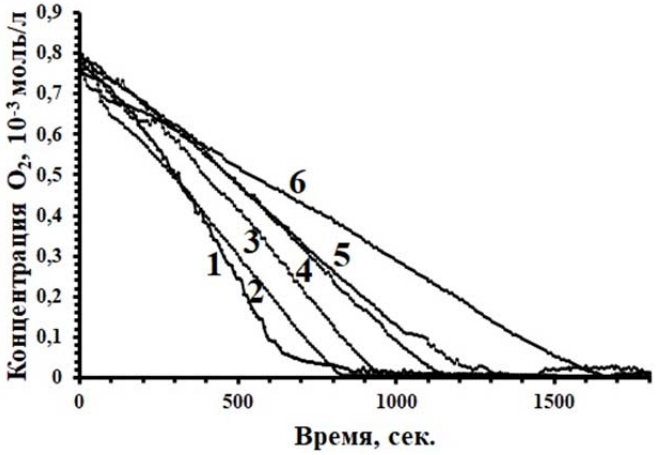

Рис. 2. Кинетические кривые поглощения кислорода в процессе пероксидного окисления метиллинолеата в мицелярных растворах в отсутствие (1) и в присутствии цианокобаламина разных концентраций – 10^{-4}M (2); 4×10^{-4}M (3); 8×10^{-4}M (4); 10^{-3}M (5); 2×10^{-3}M (6). $[ААРН]_0 = 7\times10^{-3}$M; растворитель – физиологический раствор; t = 37±0.1^{0}C.

При добавлении метилкобаламина и аденозилкобаламина в реакционную смесь проявляется обратный эффект (рис. 3). В этих случаях происходит увеличение средней скорости поглощения кислорода по сравнению с реакцией в отсутствии в реакционной смеси этих кобаламинов. Это означает, что метилкобаламин и аденозилкобаламин проявляют каталитический – прооксидантный эффект: выступают в роли катализаторов для реакции окисления метиллинолеата.

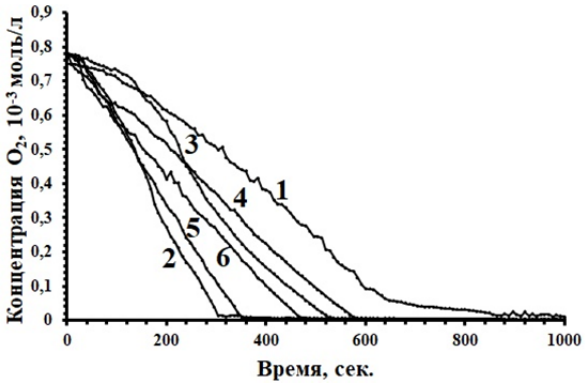

Рис. 3. Кинетические кривые поглощения кислорода в процессе пероксидного окисления метиллинолеата в отсутствие (1) и в присутствии аденозилкобаламина разных концентраций – 10^{-4}M (2); 4×10^{-4}M (3); 8×10^{-4}M (4); 10^{-3}M (5); 2×10^{-3}M (6). $[AAPH]_0 = 7\times10^{-3}$M; растворитель – физиологический раствор; $t = 37\pm0.1^0$C.

По-видимому, каталитический – прооксидантный эффект кобаламинов обусловлен каталитическим распадом гидропероксидов с образованием свободных радикалов, представленных на схеме 2.

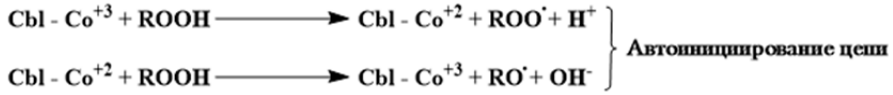

Схема 2. Каталитическое автоинициирование цепи (прооксидантные реакции).

Таблица 1

Значения средних скоростей реакции окисления метиллинолеата в отсутствие и в присутствии кобаламинов при разных концентрациях ($\times10^{-6}$ моль$\times$л$^{-1}\times$с$^{-1}$)

Кобаламины	Концентрация, моль/л					
	3×10^{-5}	10^{-4}	4×10^{-4}	8×10^{-4}	10^{-3}	2×10^{-3}
Цианокобаламин (CN)Cbl	-	0.98	0.86	0.71	0.63	0.49
Гидроксокобаламин (H_2O)Cbl	0.98	0.58	0.86	0.58	0.98	0.99
Метилкобаламин MeCbl	-	1.87	1.96	1.64	2.02	2.05
Аденозилкобаламин AdoCbl	-	1.70	1.49	1.37	2.17	1.66

Примечание. Средняя скорость реакции в отсутствие кобаламинов равна 1.14×10^{-6} моль$\times$л$^{-1}\times$с$^{-1}$.

Таблица 2

Относительная скорость реакции окисления метиллинолеата в отсутствие и в присутствии кобаламинов разных концентраций

Кобаламины	Концентрация, моль/л					
	3×10^{-5}	10^{-4}	4×10^{-4}	8×10^{-4}	10^{-3}	2×10^{-3}
Цианокобаламин (CN)Cbl	-	0.86	0.75	0.62	0.55	0.43
Гидроксокобаламин (H_2O)Cbl	0.86	0.51	0.75	0.51	0.86	0.87
Метилкобаламин MeCbl	-	1.64	1.72	1.44	1.77	1.80
Аденозилкобаламин AdoCbl	-	1.49	1.31	1.20	1.90	1.46

Соответствующие количественные результаты представлены в табл. 1 и 2, где приведены значения средних скоростей реакции окисления метиллинолеата в отсутствие и в присутствии кобаламинов разных концентраций (табл. 1), а также относительные скорости поглощения кислорода в присутствии кобаламинов по отношению к скорости поглощения кислорода в отсутствие кобаламинов (табл 2).

Согласно данным, представленным в табл. 2, наблюдается слабая зависимость антиоксидантной активности циано- и гидроксокобаламинов с увеличением их концентраций. Это свидетельствует о том, что при суммарном антиоксидантном действии этих соединений присутствует и их прооксидантное действие.

Доминирование антиоксидантных свойств по сравнению с прооксидантными в случае циано- и гидроксокобаламинов связано с их молекулярными структурными особенностями. Согласно данным работы [16] механизм антирадикального действия цианокобаламина обусловлен реакцией присоединения радикалов с 5,6-диметилбензимидазольным нуклеотидом, активированным ионом кобальта корринового кольца. Чем выше эффективный заряд иона кобальта, тем больше стабилизация результирующего радикала, образующегося в реакции присоединения, тем выше эффективность реакций радикалов с 5,6-диметилбензимидазольным нуклеотидом кобаламинов (рис. 1), приводящих к захвату радикалов. Электроноакцепторные циано- и гидроксогруппы в шестой координационной связи кобальта увеличивают его эффективный заряд и тем самым их антирадикальную активность.

Выводы. На основе полученных экспериментальных данных показано, что цианокобаламин и гидроксокобаламин проявляют антиоксидантные свойства и являются «захватчиками» свободных радикалов в реакции пероксидного окисления метиллинолеата. Они также могут выступать в качестве антиоксидантного регулятора пероксидного окисления липидов мембран клеток, действующих по механизму обрыва кинетических цепей на границе раздела фаз мембрана клетки – вода.

Установлено, что метилкобаламин и аденозилкобаламин без присутствия кофакторных соединений являются катализаторами цепной свободнорадикальной реакции окисления метиллинолеата молекулярным кислородом.

Показано, что прооксидантный эффект кобаламинов обусловлен их способностью катализировать реакцию распада гидропероксидов с образованием пероксильных и оксильных радикалов.

Работа выполнена в рамках тематического финансирования ГКН РА (18T-1D318) 2018-2020 гг.

Институт химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН РА
e-mail: zara@ichph.sci.am

З. О. Манукян, Л. А. Арутюнян, С. Г. Минасян, академик Л. А. Тавадян

Влияние витамина B12 на реакцию окисления метиллинолеата в мицелярных растворах

Исследованы антиоксидантные свойства кобаламинов – составляющих витамина B12 в мицелярной системе модельной реакции пероксидного окисления метиллинолеата молекулярным кислородом. Установлено, что цианокобаламин и гидроксокобаламин проявляют антиоксидантные свойства, ингибируя пероксидное окисление метиллинолеата. Метилкобаламин и аденозилкобаламин катализируют реакцию окисления метиллинолеата, выступая в роли катализаторов прооксидантного действия.

Զ. Հ. Մանուկյան, Լ. Հ. Հարությունյան, Ս. Հ. Մինասյան, ակադեմիկոս Լ. Ա. Թավադյան

Վիտամին B12-ի ազդեցությունը միցելային համակարգում մեթիլլինոլեատի օքսիդացման ռեակցիայի վրա

Ուսումնասիրվել են վիտամին B12-ի բաղադրիչների՝ կոբալամինների հակաօքսիդիչ հատկությունները մոլեկուլային թթվածնով մեթիլլինոլեատի պերօքսիդացման մոդելային ռեակցիայի միցելային համակարգում: Հաստատվել է, որ ցիանոկոբալամինը և հիդրօքսոկոբալամինը դրսևորում են հակաօքսիդիչ հատկություններ՝ արգելակելով մեթիլլինոլեատի պերօքսիդացման ռեակցիան: Մեթիլկոբալամինը և ադենոզիլկոբալամինը կատալիզում են մեթիլլինոլեատի օքսիդացման ռեակցիան՝ որպես պրոօքսիդիչ ազդեցությամբ կատալիզատորներ:

Z. H. Manukyan, L. H. Harutyunyan, S. H. Minasyan,
academician L.A. Tavadyan

Effect of Vitamin B12 on Oxidation Reaction of Methyllinoleate in Micellar Solutions

The antioxidant properties of cobalamins were studied in the micellar system of the model reaction of methyl linoleate peroxide oxidation with molecular oxygen. It was established that cyanocobalamin and hydroxocobalamin exhibit antioxidant properties, thus inhibiting the peroxidation of methyl linoleate. Methylcobalamin and adenosyl-cobalamin, catalyze the oxidation reaction of methyllinoleate acting as prooxidant catalysts.

Литература

1. *Jihoe K., Carmen G., Ruma B.* – Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2008. V. 105. № 38. P. 14551-14554.
2. *Хапалюк А. В.* – Лечебное дело. 2019. Т. 68. № 4. С. 17-23.
3. *Lawrence A. D., Deery E., McLean K. J. et al.* – Journal of Biological Chemistry. 2008. V. 283. № 16. P. 10813-10821.
4. *Giedyk M., Goliszewska K., Gryko D.* – Chemical Society Reviews. 2015. V. 44. № 11. P. 3391-3404.
5. *Abu-Soud H. M., Maitra D., Byun J. et al.* – Free Radical Biology and Medicine. 2012. V. 52. P. 616-625.
6. *Jeong J., Ha T. S., Kim J.* – Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology. BMB Reports. 2011. V. 44. № 3. P. 171-175.
7. *Van de Lagemaat E. E., de Groot L. C. P. G. M., van den Heuvel E. G. H. M.* – Nutrients. 2019. V. 482. № 11. P. 1-16.
8. *Salnikov D. S., Makarov S. V.* – New Journal of Chemistry. 2019. V. 43. № 20. P. 1-8.
9. *Misra U. K., Kalita J., Singh S. K. et al.* – Molecular Neurobiology. 2017. V. 54. № 2. P. 1278-1284. –
10. *Tavadyan L. A., Khachoyan A., Martoyan G. et al.* – Chemistry and Physics of Lipids. 2007. V. 147. № 1. P. 30-45.
11. *Birch C. S., Brasch N. E., McCaddon A. et al.* – Free Radical Biology and Medicine. 2009. V. 47. P. 184-188.
12. *Bito T., Misaki T., Yabuta Y., Ishikawa T. et al.* – Redox Biology. 2017. V. 11. P. 21-29.
13. *Ronco A. M., Garrido A., Lianos M. N. et al.* – Lipids. 2005. V. 40. № 3. P. 259-264.
14. *Рогинский В. А.*– Кинетика и катализ. 1996. Т. 3. №4. С. 521-527.
15. *Pliss E. M., Loshadkin D. V., Grobov A. M. et al.* – Russian Journal of Physical Chemistry B. 2015. V. 9. № 1. P. 127-131.
16. *Минасян С. Г., Мхитарян Л. Н., Манукян З. О. и др.* - Доклады НАН РА. 2019. Т. 119. № 3. С. 240-248.