

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МАГНИЯ С СЕМИХИНОНОВЫМИ РАДИКАЛАМИ ТАЙРОНА – ИНДИКАТОРА АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2023 г. Л.Ю. Устынюк*, В.А. Медведева*, **, С.О. Любимовский***, Э.К. Рууге*, **, А.Н. Тихонов*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Россия
E-mail: #leila_ust@mail.ru, ##an_tikhonov@mail.ru

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, ул. Академика Чазова, 15а, Москва, 121552, Россия

***Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, ул. Вавилова, 38, Москва, 119991, Россия

Поступила в редакцию 17.09.23 г.

После доработки 17.09.23 г.

Принята к публикации 04.10.23 г.

С использованием экспериментальных (ЭПР) и квантово-химических (теория функционала плотности) методов исследования показано, что наблюдавшиеся нами ранее изменения в спектре ЭПР семихинонового радикала тайрона в морской воде обусловлены его взаимодействием с ионами Mg^{2+} . Образование комплекса между Mg^{2+} и радикалом тайрона обусловлено электростатическим притяжением ионов, несущих на себе большие заряды противоположного знака (+2 и -3), с одной стороны, и способностью ионов Mg^{2+} эффективно связываться с бидентатными кислородсодержащими лигандами, с другой стороны. Образование тесных контактных ионных пар приводит к перераспределению электронной и спиновой плотности в радикале тайрона, о чем можно судить по наблюдаемым изменениям в спектре ЭПР этого радикала.

Ключевые слова: свободные радикалы, активные формы кислорода, тайрон, вода, хлорид магния, семихинон, ЭПР, теория функционала плотности.

DOI: 10.31857/S0006302923060017, EDN: ROAOII

Активные формы кислорода (АФК), такие как супероксидный анион-радикал $O_2^{\bullet-}$, гидроксильный радикал $HO^{\bullet}$, пероксид водорода H_2O_2 и синглетный кислород 1O_2 , образуются в разных молекулярных системах. В биологических системах АФК были обнаружены в середине XX века, когда появились сообщения, что АФК могут образовываться в качестве побочных продуктов ферментативных реакций *in vivo* [1]. Установлено, что АФК могут приводить к повреждению клеточных структур [2], вызывая различные патологии, среди которых ишемия, атеросклероз и т.д.

При изучении биологических процессов, протекающих с участием свободных радикалов, важную роль играет метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), позволяющий обнаруживать

АФК с помощью так называемых спиновых ловушек или специальных молекул-индикаторов, взаимодействующих с короткоживущими АФК [3]. Спектры ЭПР парамагнитных соединений, образующихся при взаимодействии индикаторов с АФК, позволяют следить за образованием АФК. В биофизических и биохимических исследованиях в качестве одного из таких индикаторов часто используется 4,5-дигидроксibenзол-1,3-дисульфат натрия (тайрон, TIRON). Структурной особенностью тайрона (рис. 1) является наличие циклической системы сопряженных двойных связей $C=C$ и включение атомов кислорода в положения 4- и 5- кольца C_6 в систему сопряженных связей [3]. Тайрон существует в восстановленной (хинольной, TN_2), окисленной (хиноновой, T) и промежуточной (семихиноновой, $T^{\bullet-}$ или $TN^{\bullet}$) формах, взаимные превращения между которыми сопровождаются перестройкой системы двойных связей.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, тайрон – 4,5-дигидроксibenзол-1,3-дисульфат, СТВ – сверхтонкое взаимодействие, СТС – сверхтонкая структура, КЧ – координационное число.

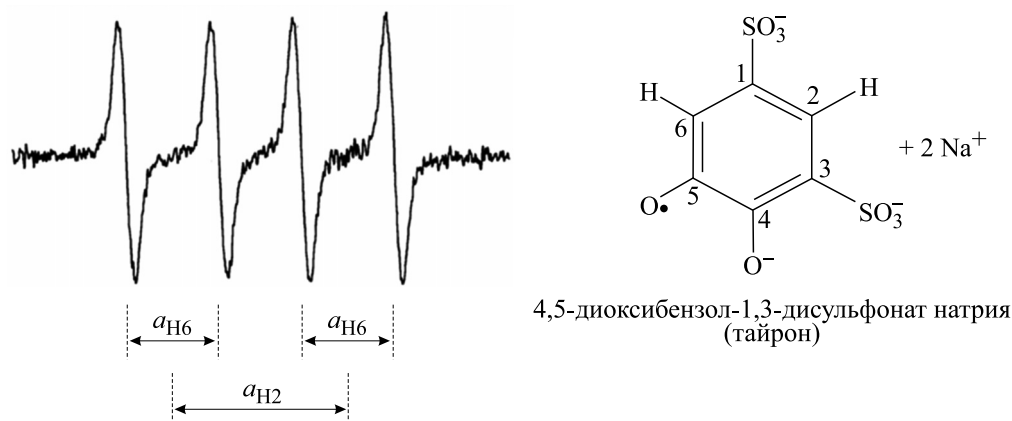


Рис. 1. Спектр ЭПР радикала семихиноновой формы тайрона в воде и структура этого радикала. Сверхтонкая структура спектра ЭПР обусловлена взаимодействием неспаренного электрона с атомами водорода в положениях 2 и 6 бензольного кольца. Величины констант СТВ, обозначенных как a_{H2} и a_{H6} , определяются по соответствующим расстояниям между линиями СТС.

Тайрон является «многоцелевым» реагентом. Он может служить не только индикатором образования АФК [4], но также использоваться в качестве хелатирующего агента при определении и детоксикации следовых количеств некоторых катионов металлов [5] и применяться в качестве субстрата в реакциях с переносом электрона [6]. Тайрон в форме TN_2 , применяемый в качестве индикатора АФК, действует как реагент, окисляемый супероксидным радикалом $O_2^{\bullet-}$ [7–9]. В результате окисления восстановленной формы TN_2 супероксидным радикалом возникают характерные сигналы ЭПР семихиноновой формы индикатора, по интенсивности которых можно судить о генерации $O_2^{\bullet-}$ [8]. В стационарных условиях квадрат концентрации радикалов, измеряемой по их спектрам ЭПР, пропорционален скорости образованию $O_2^{\bullet-}$ [9, 10].

Параметры спектров ЭПР радикалов тайрона зависят от физико-химических свойств среды, окружающей радикалы. Изменение pH раствора влияет на зарядовое состояние радикалов тайрона за счет их протонирования/депротонирования ($TN^{\bullet} \rightleftharpoons T^{\bullet-} + H^+$, где $TN^{\bullet}$ – протонированная форма, $T^{\bullet-}$ – депротонированная форма). Депротонированные радикалы имеют большее время жизни по сравнению с протонированной формой, поскольку для них медленнее протекает реакция диспропорционирования, приводящая к потере парамагнетизма ($2TN^{\bullet} \rightleftharpoons T + TN_2$) [11].

Одной из характерных особенностей тайрона является его способность образовывать комплексы с катионами двухвалентных металлов. Образование комплексов может влиять на распределение электронной плотности в молекулах индикатора,

о чем можно судить по их спектрам ЭПР [11, 12]. В биологических системах присутствуют различные катионы; во всех случаях в них имеются ионы Mg^{2+} , которые играют важную функциональную роль и участвуют в формировании молекулярных структур клетки. Поэтому изучение электронной структуры молекулы тайрона и влияния ионов Mg^{2+} на спектры ЭПР его радикалов остается актуальной задачей физико-химической биологии, связанной с диагностикой АФК. Для решения этой задачи в настоящей работе изучено влияние ионов Mg^{2+} на спектры ЭПР радикалов тайрона в водных растворах и проведен квантово-химический анализ того, как образование комплекса между тайроном и ионами Mg^{2+} в воде влияет на величину спиновой плотности на атомах H2 и H6 в молекуле радикала (рис. 1), что приводит к изменению величин констант сверхтонкого взаимодействия (СТВ) с ядрами этих атомов, определяемых из эксперимента методом ЭПР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЭПР-исследования. Для оценки влияния ионов Mg^{2+} на спектры ЭПР радикалов тайрона были изучены растворы, приготовленные с использованием трис-НСI-буфера (pH варьировали от 6 до 9). В качестве АФК-генерирующей системы использовали модельную систему «ксантин–ксантиноксидаза». Подробности опытов по генерации супероксидных радикалов и регистрации сигналов ЭПР тайрона были подробно описаны в работах [9, 10].

Спектры ЭПР регистрировали с помощью спектрометров ЭПР модели E-109E (Varian, США) и малогабаритного автоматизированного

спектрометра ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Республика Беларусь). Реакционная смесь, в которой генерировались супероксидные радикалы, содержала ксантин (0.2 мМ), ксантинооксидазу (200 мкг/мл), тайрон (10 мМ), трис-НCl (1 М, рН = 6–9), а также MgCl_2 в концентрации от 10 мМ до 1 М. Реакционную смесь вводили в газопроницаемую капиллярную трубку PTFE Sub-Lite-Wall (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Капилляр с образцом вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, открытую с обоих концов. Это обеспечивало доступ воздуха (21% O_2) к образцу во время регистрации спектра ЭПР. Условия записи спектров ЭПР тайрона: СВЧ мощность — 10 мВт, амплитуда ВЧ-модуляции — 0.05 мТл.

Для каждой концентрации исследуемых веществ измерения проводили в трех-пяти повторях. Значения констант СТВ определяли из спектров ЭПР так, как это показано на рис. 1 и 2. Для каждой из экспериментальных групп данных вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для сравнения средних значений констант СТВ использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для оценки достоверности отличий между группами, различия между группами считали значимыми при $P < 0.05$. В работе использовали реактивы фирм Sigma (США), ICN (США), Serva (Германия), Aldrich (США).

Квантово-химическое моделирование. Для проведения квантово-химических расчетов использовали некоммерческую программу «ПРИРОДА» [13, 14] и функционал обобщенного градиентного типа PBE [15], хорошо зарекомендовавшие себя при моделировании спектров ЭПР семихинонового радикала тайрона [12] в воде и спектров ЭПР других радикалов, в частности нитроксильного типа [16, 17]. Для решения уравнений Кона–Шэма использованы трехэкспонентные базисные наборы (3z), представляющие собой сжатые наборы функций гауссова типа. Для разложения электронной плотности использованы вспомогательные базисы, представляющие собой несжатые наборы гауссовых функций [13, 14]. Схемы построения данных базисных наборов для атомов элементов, присутствующих в исследуемых молекулярных системах: 1) орбитальные базисы — (5s1p)/[3s1p] для Н, (11s6p2d)/[6s3p2d] для С и О, (14s10p)/[9s5p] для Mg, (15s11p2d)/[10s6p2d] для S; 2) вспомогательные базисы — (5s2p) для Н, (10s3p3d1f) для С и О, (14s3p2d) для Mg, (14s3p3d1f1g) для S.

Оптимизацию геометрических параметров во всех случаях выполняли без ограничений на симметрию молекулы. Для изолированных (приближение газовой фазы) структур оптимизацию за-

канчивали расчетом вторых производных энергии по координатам атомных ядер (гесссиана). Это позволило доказать, что все полученные структуры соответствуют минимумам на поверхности потенциальной энергии рассматриваемых молекулярных систем. Для семихинонового радикала тайрона в воде и газовой фазе в приближении PBE/3z («ПРИРОДА») рассчитывали величину $\langle S^2 \rangle$, характеризующую чистоту спинового состояния. Во всех случаях — как в газовой фазе, так и в воде — было получено значение $\langle S^2 \rangle = 0.752$, очень близкое к значению $\langle S^2 \rangle = 0.750$ для чистого спинового состояния электрона (спин $S = 1/2$).

Рассчитывали значение спиновой плотности $\rho(r_n)$ на ядрах в атомных единицах. Зная коэффициент пропорциональности между константой изотропного СТВ и спиновой плотностью на ядре, вычисляли значения констант СТВ и сравнивали их с экспериментальными данными. Для ядра ^1H константа изотропного СТВ равна:

$$a = \frac{8}{3} \cdot \pi g_e \beta_e g_n \beta_n \rho(r_n), \quad (1)$$

где g_e — g-фактор свободного электрона, β_e — магнетон Бора, g_n и β_n — ядерный g-фактор и ядерный магнетон соответственно, $\rho(r_n)$ — спиновая плотность на ядре [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭПР. Спектр ЭПР семихиноновой формы тайрона в водном растворе, не содержащем MgCl_2 , представляет собой квартет линий сверхтонкой структуры (СТС) (рис. 1), возникающий в результате взаимодействия неспаренного электрона с двумя неэквивалентными протонами. Четыре линии близкой интенсивности (дублет дублетов) обусловлены изотропным взаимодействием неспаренного электрона, делокализованного в сопряженной π -системе, с ядрами ^1H двух атомов водорода бензольного кольца (H2 и H6). Константы сверхтонкого взаимодействия этого радикала в водном растворе в отсутствие MgCl_2 , измеренные в настоящей работе, равны $a_{\text{H2}} = 0.36$ мТл и $a_{\text{H6}} = 0.19$ мТл, что совпадает со средними значениями, полученными разными авторами ($a_{\text{H2}} = 0.36 \pm 0.03$ мТл и $a_{\text{H6}} = 0.18 \pm 0.01$ мТл) и приведенными ранее в нашей работе [12].

Помимо окисления тайрона супероксидом, который в нашей системе генерировался за счет ксантин-ксантинооксидазной системы, тайрон может быть окислен до семихинонового радикала гидроксильным радикалом $\text{HO}^\bullet$, а также алкоксильными радикалами [7]. Кроме этого, в щелочной среде (рН ≥ 8.0) наблюдается появление сигнала ЭПР семихинонового радикала за счет окис-

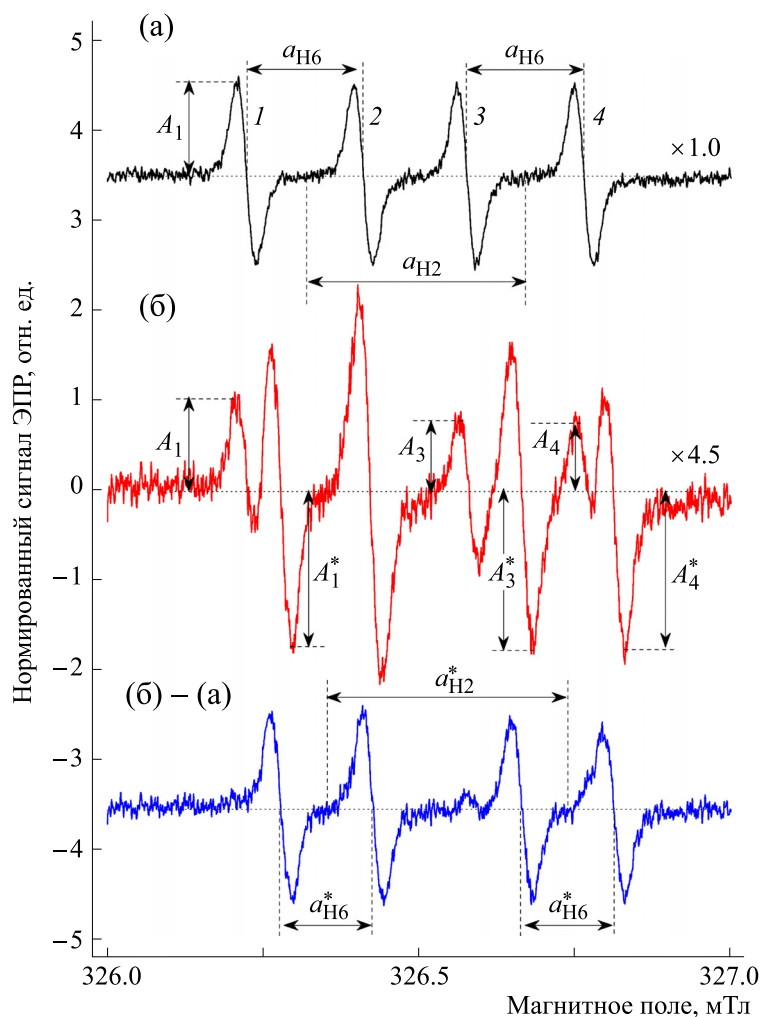


Рис. 2. Влияние MgCl_2 на спектры ЭПР радикала тайрона. Спектр (а) — в отсутствие MgCl_2 , спектр (б) — в присутствии 40 мМ MgCl_2 . В нижней части рисунка показана разность сигналов (б) и (а), нормированных на амплитуду линии A_1 .

ления тайрона молекулярным кислородом O_2 . Сигнал ЭПР радикала тайрона в кислой среде ($\text{pH} < 6$), как правило, не наблюдается [10–12]. Это происходит, вероятнее всего, вследствие реакции дисмутации протонированных форм этого радикала.

Влияние MgCl_2 на спектры ЭПР семихиноновой формы тайрона. На рис. 2 показаны спектры ЭПР радикалов тайрона, измеренные в исходном растворе без MgCl_2 (спектр на рис. 2а) и в присутствии 40 мМ MgCl_2 в среде инкубации при pH 7.4 (спектр на рис. 2б). Видно, что в присутствии MgCl_2 в спектре ЭПР появляются дополнительные линии, смещенные относительно линий исходного спектра, измеренного в отсутствие MgCl_2 . При этом положение второй линии СТС практически совпадает для сигналов ЭПР в контрольном образце (без MgCl_2) и в присутствии 40 мМ MgCl_2 . Как будет показано далее, наблю-

даемое явление — появление новых линий СТС — связано с возникновением комплексов $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, которые дают сигналы ЭПР с измененными константами СТВ. В присутствии MgCl_2 наблюдается некоторое уменьшение амплитуд всех линий сигнала ЭПР; это обусловлено тем, что в этом случае спектр ЭПР — суть суперпозиция спектров от двух фракций радикалов (свободного и связанного с Mg^{2+}).

Приведенные на рис. 2 спектры ЭПР были получены с помощью спектрометра Е–109Е, снабженного системой для точного определения g -фактора (field frequency lock), которая позволяет фиксировать положения спектров ЭПР относительно их g -факторов и корректно находить разностные спектры ЭПР. Это позволило корректно разделить сигналы ЭПР двух фракций радикалов и выделить сигнал ЭПР от комплексов $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$. Для получения разностного сигнала, принадле-

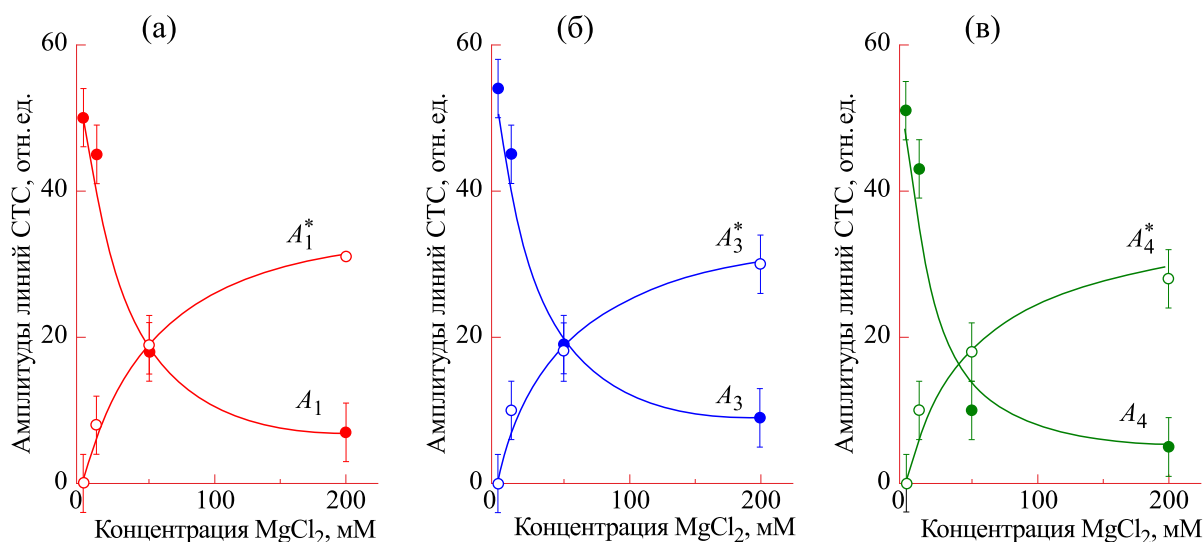


Рис. 3. Влияние MgCl_2 на амплитуды различных линий спектра ЭПР радикала тайрона (см. маркировку линий на рис. 2).

жащего комплексам $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, исходные спектры ЭПР были нормированы таким образом, чтобы амплитуды первой линии контрольного сигнала и первой компоненты сигнала ЭПР, записанного в присутствии MgCl_2 , которые обозначены символами A_1 , были выровнены по величине. В этом случае разностный спектр ЭПР на рис. 2 ((б) — (а)) с определенностью можно отнести к фракции радикалов, образующих комплексы с ионами Mg^{2+} .

Из рис. 2 видно, что константы СТВ $a_{\text{H}6}$ и $a_{\text{H}2}$ для двух фракций заметно различаются. В отсутствие MgCl_2 эти константы составляют $a_{\text{H}2} = 0.36$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.19$ мТл. Фракция радикала, образующего комплекс с Mg^{2+} , характеризуется значениями $a_{\text{H}2}^* = 0.39$ мТл и $a_{\text{H}6}^* = 0.15$ мТл (определены для раствора, содержащего 40 мМ MgCl_2). Второе различие спектров связано с тем, что образование комплекса $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$ приводит к уменьшению g -фактора сигнала ЭПР, о чем свидетельствует заметное смещение спектра в сторону более высокого магнитного поля.

В дополнение к сказанному выше можно привести данные о зависимости интенсивностей компонент спектра от концентрации MgCl_2 в растворе. Из рис. 3 видно, что с ростом концентрации MgCl_2 возрастают амплитуды линий с измененными значениями СТВ, в то время как линии исходного спектра (в растворе без MgCl_2) уменьшаются. Такая картина отражает перераспределение радикалов между свободной и связанной с Mg^{2+} формами ($\text{T}^{\bullet-}$ без Mg^{2+} и комплексы $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$): с увеличением концентрации

ионов Mg^{2+} возрастает число комплексов $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, дающих сигнал ЭПР с измененными константами СТВ (рис. 3).

Для сравнения аналогичное исследование было выполнено с растворами NaCl . Добавление NaCl в тех же концентрациях, что и MgCl_2 , практически не влияло на значения констант СТВ семихинонового радикала тайрона в диапазоне от 0 до 200 мМ NaCl (данные не приведены). Это наблюдение показывает, что именно ионы магния отвечают за описываемый эффект.

Заметим, что при значительном увеличении концентрации MgCl_2 (≥ 20 мМ) наблюдается небольшое уменьшение всех компонент СТС сигнала ЭПР. Это может быть обусловлено (по крайней мере частично) уменьшением добротности резонатора спектрометра при высоких концентрациях ионов. В пользу этого свидетельствует тот факт, что при высоких концентрациях MgCl_2 (> 50 мМ) мы наблюдали некоторое падение амплитуды сигнала ЭПР спиновой метки ТЕМРО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила), помещенной в запаянную кварцевую ампулу (данные не приведены). Нельзя также исключить, что при высоких концентрациях добавленных солей изменяется активность ксантиноксидазы, что может уменьшать скорость генерации супероксидных радикалов.

Эксперименты с растворами тайрона при постоянной концентрации MgCl_2 , но при различных значениях pH (в диапазоне от 6.2 до 9.0) показали, что при этом сохраняется положение всех четырех линий сигнала ЭПР. Значения констант СТВ остаются постоянными (данные не приведены), что свидетельствует о том, что они обуслов-

лены непосредственным влиянием иона Mg^{2+} , входящего в состав комплекса $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$. Однако амплитуда сигнала уменьшается по мере закисления среды инкубации. Это может быть связано с ускорением реакции дисмутации в результате протонирования радикала.

Квантово-химическое моделирование влияния ионов Mg^{2+} на параметры сверхтонкой структуры спектра ЭПР семихинонового радикала тайрона. Экспериментальные данные о влиянии ионов Mg^{2+} на значения констант СТВ тайрона согласуются с результатами квантово-химических расчетов методом функционала плотности. Ранее [12] нами было показано, что такие расчеты достаточно точно предсказывают значения констант СТВ радикала тайрона в водной среде. Для моделирования водного окружения радикалов были построены оболочки, состоящие из 40 молекул воды. Молекулы воды взаимодействуют как с радикалом, так и между собой. Полученные данные свидетельствуют, что наблюдаемый сигнал ЭПР принадлежит депротонированному радикалу семихинонового типа (рис. 1), несущему на себе большой отрицательный заряд ($Z = -3$), что затрудняет реакцию диспропорционирования (дисмутации) радикалов. Протонированные формы радикала в спектре ЭПР не наблюдаются, что объясняется ускоренной гибелью этих форм за счет процессов диспропорционирования [10–12].

В данной работе такой подход был использован для моделирования влияния ионов Mg^{2+} на параметры спектров ЭПР радикалов тайрона, образующих контактные ионные пары $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$. В работах [11, 12] семихиноновые радикалы тайрона регистрировали в морской воде, где основным растворенным веществом был NaCl, а MgCl_2 содержался в концентрации, на порядок меньшей, чем NaCl. В спектре ЭПР наблюдалось расщепление линий и снижение интенсивности исходного сигнала, наблюдаемого в дистиллированной воде. Очевидно, что этот эффект связан с влиянием именно ионов Mg^{2+} , присутствующих в морской воде в меньших концентрациях, чем ионы Na^+ . Приведенные ниже данные квантово-химического расчета хорошо согласуются с таким выводом.

Моделирование водной оболочки радикалов тайрона, не связанных и связанных с ионами Mg^{2+} , проводили методом, подробно описанным в работе [12]. Оно включало построение первичной оболочки из 40 молекул растворителя вокруг радикала путем последовательного добавления молекул H_2O (по 2–4 молекулы) с последующей оптимизацией структуры после каждого добавления. Полученная таким образом оптимизированная структура затем подвергалась полной перестройке системы водородных связей в водной

оболочке путем дезориентации молекул воды в ней с последующей полной оптимизацией геометрических параметров, приводившей к новой структуре такого же состава, которая, в свою очередь, подвергалась такой же перестройке. В результате таких многократных перестроек сетки водородных связей был получен набор структур ($\text{T}^{\bullet-}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ в работе [12] и $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ в настоящей работе), различающихся полными электронными энергиями, количеством водородных связей в оболочке, распределением электронной, в частности спиновой, плотности внутри радикала.

Для оценок усредненных констант СТВ использовали распределение Больцмана:

$$\langle a(H, j) \rangle = Z^{-1} \sum_i a^{(i)}(H, j) \exp\left(-\frac{\Delta E_i}{k_B T}\right), \quad (2)$$

где индекс j соответствует обозначению ядра рассматриваемого атома водорода (H), индекс i соответствует номеру рассматриваемой структуры, $Z = \sum_i \exp(-\Delta E_i / (k_B T))$ – статистическая сумма, ΔE_i – относительная энергия структуры, k_B – постоянная Больцмана, $T = 298.15$ К.

Рассчитанные по формуле (2) значения констант СТВ хорошо соответствуют экспериментальным данным [12]. Для радикала тайрона, не связанного с Mg^{2+} , усредненные константы СТВ структур состава $\text{T}^{\bullet-}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ (PBE/3z) составляют $a_{\text{H}2} = 0.37$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.18$ мТл, а для самой устойчивой из найденных структур – $a_{\text{H}2} = 0.37$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.17$ мТл. Это означает, что определяющий вклад в величину константы СТВ вносит именно самая устойчивая структура. Экспериментальные значения, измеренные в настоящей работе, составляют $a_{\text{H}2} = 0.36$ мТл и $a_{\text{H}6} = 0.19$ мТл и совпадают с рассчитанными в пределах точности измерения этих констант (0.01 мТл).

В настоящей работе для моделирования спектров ЭПР структур состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ мы применили подход, использованный нами ранее в работе [12]. Получена 21 структура такого состава, относительные энергии которых и рассчитанные константы СТВ приведены в табл. 1 в порядке возрастания их относительной энергии ΔE . Эти структуры соответствуют контактным ионным парам $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}$, которые полностью окружены 40 молекулами воды. В таких комплексах ион Mg^{2+} может быть связан с радикалом $\text{T}^{\bullet-}$ двумя способами. Первый способ (I), структуры 1 и 2 (рис. 4а и 4б соответственно): ион металла координирован по двум атомам кислорода в положениях 4 и 5 бензольного кольца. Второй тип (II), структуры 5 и 14 (рис. 4в и 4г соответственно): ион металла координирован по атому кислорода в

Таблица 1. Относительные энергии, координационные числа иона Mg^{2+} и константы СТВ для ионных пар состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ (PBE/3z)

№ структуры	$a_{\text{H}_2}^*$, мТл	$a_{\text{H}_6}^*$, мТл	Координационное число	ΔE , кДж/моль	Способ координации
1	0.40	0.16	5	0	I
2	0.44	0.22	6	13	I
3	0.27	0.15	6	19	I
4	0.36	0.13	6	20	I
5	0.46	0.18	6	32	II
6	0.40	0.17	5	33	I
7	0.40	0.19	6	41	II
8	0.27	0.14	6	45	I
9	0.38	0.13	6	49	I
10	0.41	0.14	5	50	I
11	0.37	0.09	6	77	II
12	0.32	0.13	6	95	I
13	0.44	0.17	6	99	II
14	0.54	0.30	5	104	II
15	0.31	0.17	6	104	I
16	0.34	0.12	6	109	II
17	0.33	0.13	6	113	II
18	0.37	0.09	6	114	I
19	0.41	0.15	5	114	I
20	0.51	0.24	6	136	II
21	0.39	0.20	5	143	I
Средние значения	0.40	0.16	—	—	—
Экспериментальные значения (40 мМ MgCl_2)	0.39	0.15	—	—	—

положении 4 бензольного кольца и одному из атомов кислорода ближайшей сульфогруппы (в положении 3 бензольного кольца).

Как уже было сказано выше, необходимо учитывать влияние способа формирования сетки водородных связей на константы СТВ радикала тайрона в контактных ионных парах типов I и II. Кроме того, в ионных парах $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ обоих типов меняется координационное число (КЧ) иона магния. Это связано с тем, что в первой

координационной сфере Mg^{2+} могут находиться 3 или 4 молекулы воды и КЧ с учетом двух атомов кислорода радикала составляет 5 (структуры 1 и 14 на рис. 4а и 4г соответственно) или 6 (структуры 2 и 5 на рис. 4б и 4в соответственно). Соответствующие расстояния $\text{Mg}-\text{O}$ не превышают 2.3 Å. В табл. 1 приведены относительные энергии, КЧ иона магния в оптимизированных структурах состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ и константы изотропного СТВ, рассчитанные из величин спиновой плот-

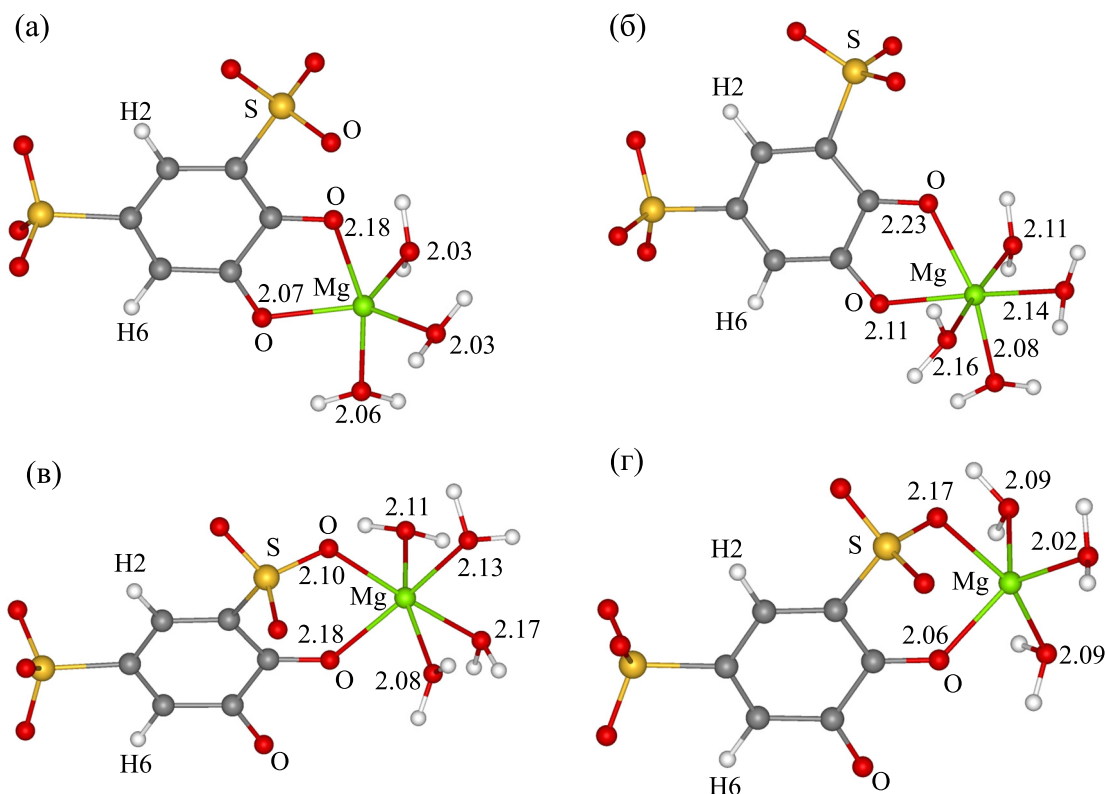


Рис. 4. Связывание семихинонового радикала тайрона с ионом Mg^{2+} . Представлены фрагменты оптимизированных структур состава $\text{T}^{\bullet-}\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_{40}$: (а) – структура 1 (I, КЧ = 5), (б) – структура 2 (I, КЧ = 6), (в) – структура 5 (II, КЧ = 6), (г) – структура 14 (II, КЧ = 5), где римскими цифрами указаны два возможных способа связывания иона Mg^{2+} (см. текст), а КЧ – координационное число иона Mg^{2+} , определяемое числом атомов кислорода, расстояние до которых от ядра атома магния не превышает 2.3 Å. Соответствующие расстояния в Å представлены на рисунке цифрами у каждого из атомов О. Молекулы воды оболочки, не связанные напрямую с ионом магния, на данном рисунке не показаны, общее число молекул воды в системе составляло 40.

ности на ядрах атомов водорода H2 и H6. Усредненные значения констант a_{H2}^* и a_{H6}^* получены с использованием выражения (2).

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы.

1) В структуре 1 (рис. 4а) с минимальной полной электронной энергией ион Mg^{2+} окружен пятью атомами кислорода, включая два атома кислорода радикала тайрона и три атома кислорода молекул водной оболочки (КЧ = 5).

2) Ион Mg^{2+} в структуре 1 и следующих за ней по энергии структурах 2–4 связан с двумя атомами кислорода бензольного кольца, то есть способ координации I соответствует структурам с более низкой энергией.

3) Усредненные значения констант СТВ очень хорошо соответствуют экспериментальным данным, полученным при регистрации спектра ЭПР в присутствии MgCl_2 (в пределах точности изме-

рений, ± 0.01 мТл), и совпадают с рассчитанными значениями констант СТВ для ионной пары 1.

Поскольку спин ядра наиболее распространенного изотопа ^{24}Mg равен нулю, наблюдаемые изменения в спектре ЭПР радикала тайрона в присутствии ионов магния могут быть связаны с перераспределением электронной (в частности, спиновой) плотности в этом радикале.

При концентрации $\text{MgCl}_2 \geq 40$ мМ в спектре ЭПР наблюдается появление новых линий СТС, что можно трактовать как суперпозицию двух сигналов, каждый из которых состоит из четырех линий СТС (рис. 2), различающихся значениями констант СТС и g -факторами. Это позволяет предположить, что при данной концентрации MgCl_2 не все радикалы $\text{T}^{\bullet-}$ связаны с ионами Mg^{2+} . Основываясь на концентрации ионов магния 50 мМ и зная объем системы состава $\text{T}^{\bullet-}(\text{H}_2\text{O})_{40}$ (для оценок была взята структура 1 с наименьшей полной электронной энергией сре-

ди структур 1-2I), можно оценить вероятность присутствия катиона магния в водной оболочке анион-радикала тайрона. Если предположить, что ионы Mg^{2+} распределены равномерно по всему объему водного раствора, вероятность образования комплекса за счет случайного столкновения ионов Mg^{2+} с радикалами составляет около 3%, что значительно меньше вклада структуры с измененными характеристиками СТС в суммарный спектр ЭПР. Однако поскольку между противоположно заряженными частицами с зарядами -3 и +2 действует электростатическое притяжение, локальная концентрация ионных пар должна быть значительно больше. За счет этого в спектре ЭПР возникает комбинация двух сигналов приблизительно одинаковой интенсивности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что изменения в спектре ЭПР водных растворов семихинонового радикала тайрона в присутствии $MgCl_2$, наблюдавшиеся ранее [11, 12], обусловлены взаимодействием ионов Mg^{2+} с семихиноновым радикалом тайрона, приводящим к образованию прочных комплексов, которые также можно рассматривать как контактные ионные пары. Они образуются благодаря электростатическому притяжению ионов, несущих заряды противоположного знака (-3 и +2), и способности ионов Mg^{2+} эффективно связываться с бидентатными кислородсодержащими лигандами. Образование тесных контактных ионных пар приводит к перераспределению электронной, в частности спиновой, плотности в радикале, о чем свидетельствуют наблюдаемые в присутствии $MgCl_2$ изменения в спектре ЭПР этого радикала.

Результаты квантово-химических расчетов в рамках метода функционала плотности, выполненных для дискретных моделей водного окружения радикала тайрона, содержащих 40 молекул воды, хорошо согласуются с выводом об образовании комплексов между ионами Mg^{2+} и этими радикалами [12]. Используемый нами подход позволяет с высокой точностью воспроизводить значения констант СТВ в семихиноновом радикале тайрона. Об этом наглядно свидетельствует сравнение экспериментальных и теоретических значений констант СТВ в дистиллированной воде и в присутствии ионов магния. В отсутствие ионов Mg^{2+} нами были получены экспериментальные значения констант: $a_{H2} = 0.36 \pm 0.01$ мТл и $a_{H6} = 0.19 \pm 0.01$ мТл, которым соответствуют теоретические константы $a_{H2} = 0.37$ мТл и $a_{H6} = 0.18$ мТл. В присутствии 40 мМ $MgCl_2$ значения СТВ равны $a_{H2}^* = 0.39 \pm 0.01$ мТл и $a_{H6}^* = 0.15 \pm$

± 0.01 мТл, им соответствуют теоретические значения $a_{H2}^* = 0.40$ мТл и $a_{H6}^* = 0.16$ мТл.

Учитывая практическую значимость исследуемой системы для обнаружения активных форм кислорода в биологических системах, мы планируем в дальнейшем распространить этот подход на другие ионы металлов, которые в таких системах могут присутствовать в заметных концентрациях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные исследования, представленные в публикации, выполнены в рамках темы «Свободные радикалы кислорода, оксид азота, индукторы гибели кардиомиоцитов и кардиопротекторные соединения при развитии патологии сердечно-сосудистой системы» (Госрегистрация № 121031300182-4) научно-исследовательских работ Кардиологического научного центра имени академика Е.И. Чазова. Квантово-химические расчеты проводились в рамках темы «Строение и динамика атомно-молекулярных систем» (№ 121031300176-3) научно-исследовательских работ МГУ имени М.В. Ломоносова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Commoner, J. Townsend, and G. E. Pake, *Nature*, **174** (4432), 689 (1954).
2. D. Harman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (11), 7124 (1981).
3. A. N. Ledenev, A. A. Konstantinov, E. Popova, and E. K. Ruuge, *Biochem. Int.*, **13** (2), 391 (1986).
4. M. A. Hemminga, *Chem. Phys. Lipids*, **32** (3–4), 323 (1983).
5. M. Otto, J. Stach, R. Kirmse, and G. Werner, *Talanta*, **28** (5), 345 (1981).
6. F. A. Taiwo, *Spectroscopy*, **22** (6), 491 (2008).
7. R. W. Miller and F. D. H. Macdowall, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 176 (1975).
8. И. В. Григолава, М. Ю. Ксензенко, А. А. Константинов и др., *Биохимия*, **45** (1), 75 (1980).
9. О. В. Коркина и Э. К. Рууге, *Биофизика*, **45** (4), 695 (2000).

10. A. L. Dudylyna, M. V. Ivanova, K. B. Shumaev, and E. K. Ruuge, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 99 (2019).
11. A. V. Peskin, Yu. A. Labas, and A. N. Tikhonov, *FEBS Lett.*, **434** (1–2), 201 (1998).
12. S. O. Liubimovskii, L. Yu. Ustynyuk, and A. N. Tikhonov, *J. Mol. Liq.*, **333**, 115810 (2021).
13. D. N. Laikov, *Chem. Phys. Lett.*, **281** (1–3), 151 (1997).
14. Д. Н. Лайков, Дисс. ... канд. физ.-мат. наук (МГУ имени М.В. Ломоносова, М., 2000).
15. J. P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.*, **77** (18), 3865 (1996).
16. L. N. Ikryannikova, L. Yu. Ustynyuk, and A. N. Tikhonov, *J. Phys. Chem. A*, **108** (21), 4759 (2004).
17. L. N. Ikryannikova, L. Yu. Ustynyuk, and A. N. Tikhonov, *Magn. Reson. Chem.*, **48** (5), 337 (2010).
18. Дж. Вертц и Дж. Болтон, *Теория и практические приложения метода ЭПР* (Мир, М., 1975).

Interaction of Magnesium Ions with Semiquinone Radicals of Tiron Used as an Indicator of Reactive Oxygen Species

L.Yu. Ustynyuk*, V.A. Medvedeva*, **, S.O. Liubimovskii*, E.K. Ruuge*, **, and A.N. Tikhonov***

**M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

***E.I. Chazov National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia*

****A.M. Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia*

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) and quantum chemical calculations based on density functional theory were used to demonstrate that the earlier observed changes in the EPR spectra of Tiron semiquinone radical dissolved in sea water solution occur due to interaction of Mg^{2+} ions with Tiron radical. This interaction is caused by electrostatic attraction between Mg^{2+} ions and Tiron radicals, which bears great charges of opposite sign (+2 and –3), on the one hand, and due to the ability of Mg^{2+} ion to bind to bidentate oxygen-containing ligands efficiently, on the other hand. The formation of tight contact ion pairs leads to electron and spin density redistribution in the Tiron radical, as can be seen by the observed changes in the EPR spectra of the radical.

Keywords: free radicals, reactive oxygen species, Tiron, water, magnesium chloride, semiquinone, EPR, density functional theory