

УДК 547.466+577.33/44

**МАКРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ  
ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В ХОДЕ РЕАКЦИИ  
НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИКИРОВАНИЯ В ВОДНЫХ  
РАСТВОРАХ ГЛИЦИНА И D-ГЛЮКОЗЫ**

**В. И. Налетов, Е. В. Буравлева, Д. С. Кононов, В. Л. Воейков**

Изучена реакция Мэйяра в водных растворах  $\alpha$ -аминокислот (глицина, лизина, аргинина) и восстанавливающих сахаров (глюкозы, ксилозы). Исследованы макрокинетические закономерности развития хемилюминесценции (ХЛ) в водных растворах глицина и глюкозы при комнатной температуре, такие как: рост и затухание «медленной вспышки» ХЛ, латентный период, «стационарное свечение», а также появление «быстрой вспышки» ХЛ после прекращения доступа кислорода или при добавлении ионов Fe(II). Показана связь кинетики развития «медленной вспышки» ХЛ с изменением концентраций основных участников процесса. Впервые обнаружено явление инициации «медленной вспышки» ХЛ, развивающейся в таких растворах при комнатной температуре после кратковременного нагревания до 94°C, и показана возможность протекания этого процесса при физиологических значениях pH.

Неферментативное гликозилирование (гликирование) свободных и связанных аминокислот или реакция Мэйяра (PM) [1] в течение последних десятилетий служит предметом исследований в пищевой химии, так как она является причиной изменения вкуса, цвета, запаха пищевых продуктов при их переработке и хранении. PM играет также важную роль в химическом старении долгоживущих белков в тканях человека [2].

Этот сложный многостадийный процесс начинается с реакции amino-карбонилирования с образованием Шиффовых оснований – альдиминов, которые претерпевают внутримолекулярную перегруппировку в 1-амино-1-дезоксикетозы (соединения Амадори). Последующие реакции дегидратации, конденсации, спонтанного распада соединений Амадори до более активных сахаров (тетроз, пентоз, деоксиглюкозонов), фрагментации, окисления и циклизации приводят к появлению разнообразных азот- и кислород-содержащих гетероциклических соединений, в том числе окрашенных и флуоресцирующих кросс-сшитых продуктов, называемых меланоидинами [3–5].

Особый интерес вызывают свободно-радикальные процессы, сопровождающие PM. Выяснилось, что продукты PM, начиная с Шиффовых оснований и кончая конечными продуктами глубокого гликирования, способны к спонтанному восстановлению кислорода до супероксид-анион радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), который затем порождает другие активные формы кислорода [4].

PM сопровождается сверхслабой хемилюминесценцией (ХЛ). Первоначально она была обнаружена в реакции между восстанавливающими сахарами и аминокислотами при температурах выше  $90^\circ$  [5–7]. Эмиссия фотонов, сопровождающая окислительные реакции, является результатом рекомбинации радикалов, главным образом перекисных, приводящей к флуоресценции синглетного кислорода и его димеров (эксимеров) [8–9] и фосфоресценции триплетных карбониллов, образующихся при распаде диоксетанов [10]. В PM диоксетаны могут возникать за счет двухэлектронного окисления Шиффовых оснований [11] и продукта их димеризации – дигидропиразина [12]. Энергия электронного возбуждения активированных в ходе реакции частиц может безызлучательно передаваться на акцепторы, присутствующие в реакционной системе, и далее излучаться ими [13–14]. В частности, анализ спектра излучения при PM между D-рибозой и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой в DMSO выявил ряд максимумов, один из которых был характерен для флуоресценции возникающих в системе продуктов PM, и ни один не коррелировал со спектром испускания триплетных состояний карбонильных соединений или синглетного кислорода и его эксимеров [13].

Ранее нами было показано, что в водных растворах глицина и ряда  $\alpha$ -L-аминокислот в присутствии  $H_2O_2$  развивается процесс, сопровождающийся люминесценцией добавляемых в систему люминофоров. Было высказано

предположение, что после инициации реакции в системе происходит накопление частиц в электронно-возбужденном состоянии, а ХЛ отражает безызлучательный перенос энергии на внесенные в систему люминофоры [15–17]. Аналогичная гипотеза была предложена и в отношении механизма генерации ХЛ в PM [13, 18–20], где люминофоры образуются эндогенно, например, при нагревании щелочных растворов. В условиях, близких к физиологическим, ХЛ наблюдать не удавалось [13, 18–20].

Как отмечалось выше, ХЛ при PM между  $\alpha$ -аминокислотами и редуцирующими сахарами ранее наблюдали лишь при температурах выше  $90^\circ$  [5–7]. Нами впервые было показано, что интенсивное нагревание нужно лишь для образования флуорофоров и субстрата, способного к спонтанному окислению, а для развития ХЛ не требуется [18–23].

Целью настоящей работы является изучение макрокинетических закономерностей инициации и развития ХЛ, сопровождающей PM, для выяснения основных факторов образования электронно-возбужденных продуктов.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали: глицин, D-глюкозу, NaOH, EDTA, DMSO (*analytical grade, Merck*), пероксидазу хрена (*research grade, Serva*) и люминол (*research grade, Sigma*).

Реактив Мэйяра готовился непосредственно перед экспериментом. Сухие навески глицина и глюкозы растворяли в деионизованной воде, очищенной по технологии *Milli-Q*. pH раствора доводили до заданных значений с помощью 3 M раствора NaOH. После этого раствор разливали в стандартные стеклянные флаконы для жидкостного сцинтилляционного счета. Полученные образцы инкубировали заданное время в водяной бане при фиксированной температуре. Точность измерения температуры составляла  $0,1^\circ$ . После двухминутного охлаждения в водяной бане до  $20^\circ$ , начинали измерение ХЛ.

ХЛ детектировали на жидкостном сцинтилляционном счетчике радиоактивности *Mark II* в режиме счета одиночных фотонов. Поскольку в спектре чувствительности фотоэлектронного умножителя 270–600 нм эффективность счета фотонов в среднем соответствует 10%, достигая максимума (~30%) при 400 нм, на один зарегистрированный импульс приходилось примерно 10 фотонов с длиной волны в диапазоне чувствительности детектора.

Изучение зависимости ХЛ от начальных условий проводили при параллельном измерении ХЛ в серии из нескольких образцов. Опыты по каждой из поставленных задач воспроизводились не менее чем в трех независимых экспериментальных сериях.

Определение гидропероксидов производили по модифицированной методике [27] с использованием люминол-пероксидазной системы. Среднее значение и статистический разброс определялся по результатам пяти измерений.

Непрерывную регистрацию изменения оптического поглощения при 305 нм проводили на проточном спектрофотометре «Spectrochrom M», регистрацию изменения флуоресценции – на проточном широкополосном флуориметре «836 Multi-Wavelength Photometer» при непрерывном отборе 0,1 мл/мин с помощью перистальтического насоса. Возбуждающее флуоресценцию излучение ртутной лампы среднего давления с фильтром «Corning CS-7-60» (диапазон 10%-го пропускания 320–390 нм), отсекалось фильтром «Corning CS-3-72» (коротковолновая граница 10%-го пропускания 450 нм). Спектр поглощения и изменение поглощения при 305 нм в отдельных пробах измеряли на спектрофотометре «Specord UV-Vis», спектр флуоресценции – на спектрофлуориметре «Hitachi F3000».

Для компьютерной обработки экспериментальных данных использовалась программа Statistica 5.0.

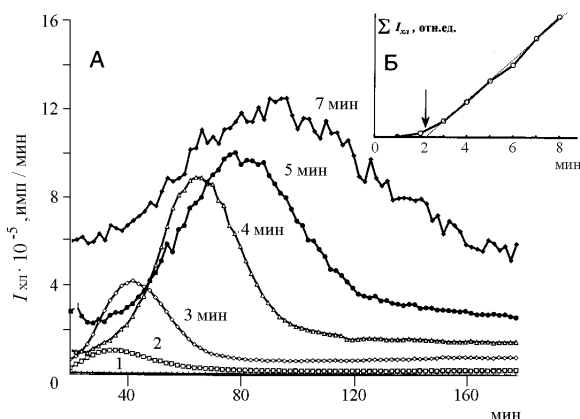


Рис. 1. Развитие ХЛ в зависимости от времени термоиндукции раствора глицин/глюкоза (0,12 М; 0,12 М; рН 11,3; 5 мл) при 94° (А). Зависимость интегральной ХЛ от времени термоиндукции (Б)

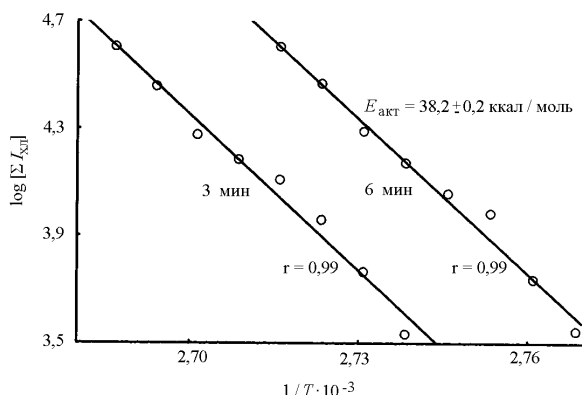


Рис. 2. Зависимость интегральной ХЛ от температуры индукции в координатах Аррениуса. Растворы глицин/глюкоза (0,12 М; 0,12 М; рН 11,3; 5 мл) инкубировались в течение 3 или 6 мин при разной температуре в диапазоне 88–99°

## Результаты и их обсуждение

Во всех представленных экспериментах в качестве базовой использовали стандартную систему глицин/глюкоза (0,12 М; 0,12 М; рН 11,3; 5 мл), инкубированную в течение 3 мин при 94° (термоиндукция) и 2 мин при 20° (охлаждение) в аэробных условиях. В серии из восьми одинаковых образцов менялся только один из параметров: время или температура термоиндукции (рис. 1, 2), аэробные условия (рис. 3), рН раствора в ходе термоиндукции или после нее (рис. 4, 5).

После 2 мин инкубации щелочного раствора глицина и глюкозы при температуре 94° в нем после охлаждения наблюдается «медленная вспышка» ХЛ (рис. 1А). С увеличением времени инкубации раствора от 3 до 7 мин амплитуда вспышки ХЛ растет и изменяется ее форма. Максимум кривой ХЛ сдвигается вправо, и кривая становится все менее гладкой. При этом интегральное количество

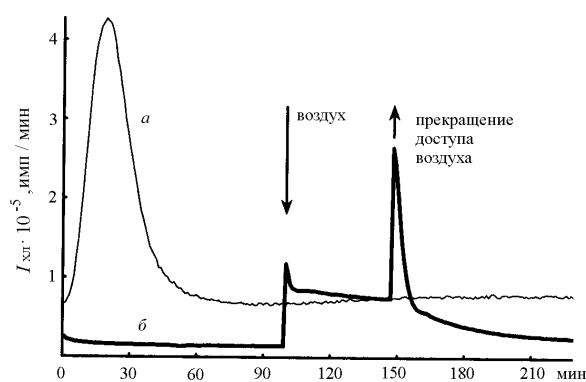


Рис. 3. Развитие ХЛ в растворах глицин/глюкоза (0,12 М; 0,12 М; рН 11,3; 5 мл) после термоиндукции без доступа кислорода: при последующем постоянном (а) или 50-минутном контакте с воздухом через 100 мин после термоиндукции (б)

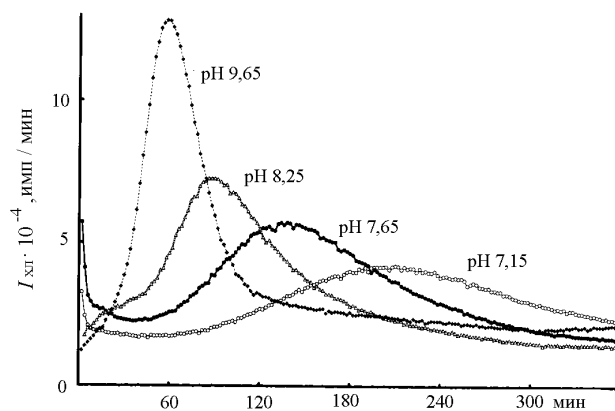


Рис. 4. Развитие ХЛ в растворах глицин/глюкоза (0,12 М; 0,12 М; 5 мл) инкубированных 3 мин при температуре водяной бани 94° и начального рН 11,3 после охлаждения до комнатной температуры и доведения рН растворов до значений, приведенных на рисунке

импульсов (рис. 1Б) возрастает линейно с увеличением продолжительности инкубации. Начало линейной зависимости приходится на 2,3 мин. Таким образом, даже кратковременное нагревание реакционной смеси до 94° приводит к образованию продуктов, которые после охлаждения раствора не теряют своей способности вступать в реакции, сопровождающиеся ХЛ.

Интегральное число импульсов, зафиксированных к любому моменту времени после выхода «медленной вспышки» ХЛ, связанное с исходным содержанием такого субстрата, пропорционально времени термоиндукции. После выхода «медленной вспышки» ХЛ выходит на стационарный уровень, тоже пропорциональный времени термоиндукции и, по-видимому, обусловленный окислением долгоживущих продуктов термоиндукции или(и) вновь образуемого субстрата.

Линейная зависимость интегральной ХЛ от времени термоиндукции свидетельствует в пользу того, что механизм термоиндукции ХЛ не зависит от времени нагревания, и позволяет оценить эффективную энергию активации образования субстрата. Для получения зависимости интегральной ХЛ от температуры термоиндукции, стандартный раствор инкубировали 3 и 6 мин при разных температурах в диапазоне от 88 до 99° с шагом в 1° (рис. 2). При 3- и 6-минутной инкубации было получено одно и то же значение энергии активации, равное 38 ккал/моль.

Для выяснения роли карбонильных и аминных соединений в развитии ХЛ были проделаны контрольные эксперименты в тех же условиях, в отсутствие одного из реагентов. Все контрольные эксперименты показали очень низкий уровень и отсутствие фазы роста ХЛ, характерной для системы глицин/глюкоза, тем самым подтвердив ключевую роль стадии amino-карбонилирования в развитии ХЛ.

Так как в литературе [7, 13] имеются указания на зависимость ХЛ в РМ от присутствия кислорода, то для того чтобы понять на какую стадию влияет аэробный фактор в нашей системе, был проделан ряд опытов, в которых хемилюминесценция регистрировалась без доступа воздуха и в аэробных условиях после термоиндукции без доступа кислорода (рис. 3).

ХЛ после термоиндукции без доступа кислорода развивается только в его присутствии (рис. 3 а). При этом ХЛ дает характерную «медленную вспышку», отличающуюся от контроля большей интенсивностью. В противном случае наблюдается очень низкий уровень излучения (рис. 3 б). Если в какой-то момент обеспечить доступ воздуха в такой раствор и через некоторое время опять перекрыть его, наблюдаются две «быстрые вспышки» ХЛ, между которыми интенсивность ХЛ приближается к аэробному контролю, а потом опять уменьшается до исходного уровня. Следовательно, присутствие кислорода не является необходимым условием процесса

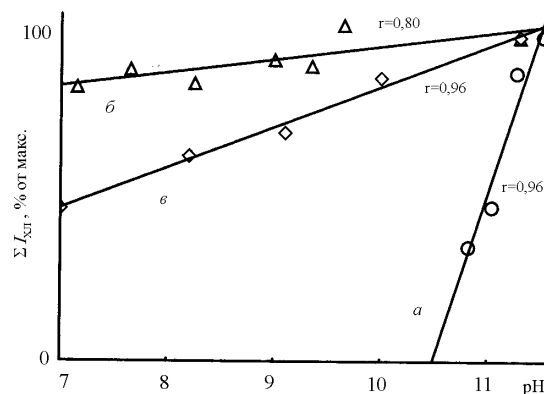


Рис. 5. Зависимость интегральной ХЛ в ходе «медленной вспышки» от pH. Различные значения pH при прочих равных условиях (0,12 M Gly, 0,12 M Glc, нагрев до 94° 3 мин) задавались: перед 1-й индукцией (а); сразу после 1-й индукции (б); перед 2-й индукцией (в)

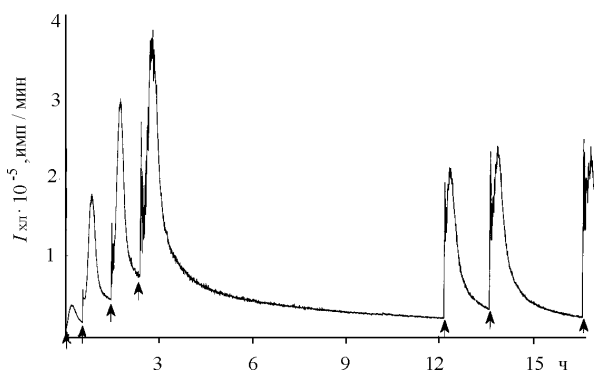


Рис. 6. «Медленные вспышки» ХЛ в растворе глицин/глюкоза (0,12 M; 0,12 M; pH 11,3; 5 мл), после повторных термоиндукций (3 мин при 94°, 2 мин при 20°, моменты термоиндукции указаны стрелками)

термоиндукции и требуется лишь для последующего развития ХЛ.

В работах [7, 13] отмечается сильная pH-зависимость ХЛ при постоянно высокой температуре. Мы впервые исследовали pH-зависимость ХЛ в системе глицин/глюкоза при комнатной температуре после кратковременного нагревания. В результате был определен диапазон значений pH 11,0–11,6, оптимальный с точки зрения воспроизводимости гладкой куполообразной кривой «медленной вспышки» ХЛ. При меньших значениях pH «медленная вспышка» ХЛ слаба, плохо выражена и появляется после продолжительного латентного периода, при больших – сильно затягивается, а ее поведение становится непредсказуемым.

Для того чтобы понять, на какую стадию хемилюминесцентного процесса влияет pH, была поставлена серия экспериментов, в которых термоиндукцию проводили в

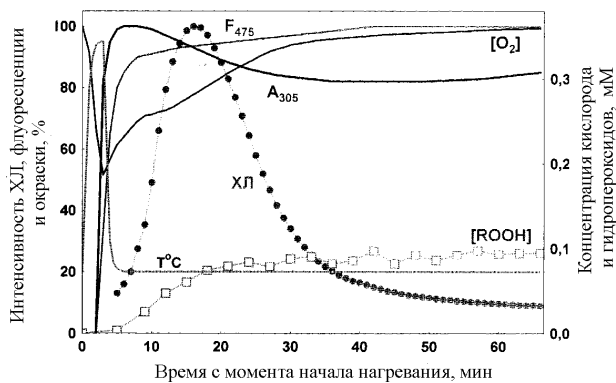


Рис. 7. Развитие ХЛ, флуоресценции ( $F_{475}$ ) и оптической плотности ( $A_{305}$ ), рост концентрации кислорода ( $[O_2]$ ) и гидропероксидов ( $[ROOH]$ ) в растворе глицин/глюкоза (0,12 М; 0,12 М; рН 11,3; 5 мл) в ходе и после цикла нагревание/охлаждение

одинаковых условиях, после чего рН доводили до значений, приведенных на рис. 4.

На рис. 4 отчетливо видны основные особенности, характерные для кривых перекисного окисления: латентный период в развитии «медленной вспышки» и квазистационарный уровень ХЛ. Несмотря на то, что с уменьшением рН латентный период и развитие «медленной вспышки» ХЛ затягивается во времени, интегральная ХЛ снижается незначительно (рис. 5 б). Тем самым нам впервые удалось показать, что развитие «медленной вспышки» ХЛ может идти при физиологических значениях рН.

Выход вторично индуцированной в таких образцах «медленной вспышки» ХЛ зависит от рН в большей степени (рис. 5 в). Наиболее крутая зависимость выхода ХЛ наблюдалась в образцах с исходно разными значениями рН (рис. 5 а). Такая критичность позволяет говорить о существовании порогового значения рН, необходимого для появления первой «медленной вспышки» ХЛ, в диапазоне от 10,5 до 10,8.

Таким образом, значение рН критично только на стадии начальной термоиндукции и не является ключевым фактором ни для последующего развития ХЛ, ни для повторной термоиндукции. Принципиальным результатом является то, что развитие «медленной вспышки» ХЛ идет при комнатной температуре и физиологическом рН.

Используя в качестве аминного компонента L-аргинин или L-лизин, как в присутствии D-глюкозы, так и D-ксилозы, удалось снизить до физиологических значений и рН начальной термоиндукции. Однако в этом случае механизм развития ХЛ осложняется участием двух разных аминокрупп.

Согласно [24] развитие РМ коррелирует с накоплением перекисных соединений. В данной модельной системе это было подтверждено прямым измерением с помощью специфического пероксидазного теста (рис. 7) и в опытах с добавлением неспецифического катализатора их распада

(Fe(II)) в различные моменты развития «медленной вспышки». Сразу после добавления наблюдалась «быстрая вспышка» ХЛ, после чего «медленная вспышка» подавлялась.

Мы предположили, что повторное кратковременное нагревание при избытке исходных реагентов приводит также к термическому разложению перекисных продуктов первой термоиндукции, и, следовательно, к более интенсивной ХЛ [22]. Это было подтверждено в эксперименте с повторной термоиндукцией «медленной вспышки» ХЛ на разных стадиях развития предыдущей. Интенсивность первой «медленной вспышки» ХЛ всегда была значительно ниже последующих (рис. 6). Сходство последующих «медленных вспышек» ХЛ по форме и интенсивности, по-видимому, свидетельствует об отсутствии принципиальных отличий в механизме их термоиндукции, а также о ничтожном расходе реагентов в процессе таких многократных реинициаций.

В настоящее время известно уже более 30 конечных продуктов РМ в аналогичных модельных системах, в то время как сведения по промежуточным продуктам крайне ограничены и противоречивы. С другой стороны, имеются данные о корреляции ХЛ с появлением окрашенных и флуоресцирующих продуктов неизвестной структуры. Поэтому мы не ставили перед собой задачи четкой идентификации промежуточных продуктов РМ, а следили за их накоплением по динамике изменения окраски и флуоресценции. Электронные спектры реакционной смеси после термоиндукции обнаруживают по одному выраженному максимуму поглощения 300–310 нм и флуоресценции 475 нм при максимуме возбуждения 390 нм.

Чтобы сопоставить изменение основных факторов хемилюминесцентного процесса между собой, была поставлена серия из восьми экспериментов с параллельным измерением основных показателей, таких как: уровень ХЛ, изменение интенсивности голубой флуоресценции ( $F_{475}$ ) и оптической плотности при 305 нм ( $A_{305}$ ), изменение концентрации гидропероксидов  $[ROOH]$  и кислорода  $[O_2]$  (рис. 7).

Развитие окраски и флуоресценции начинается ровно в начале третьей минуты инкубации. После прекращения нагревания и в процессе охлаждения их рост продолжается с некоторым замедлением. В то время как рост флуоресценции продолжается, оптическая плотность раствора, достигнув максимума к моменту начала регистрации ХЛ, падает почти на 20% от исходного уровня в противофазе «медленной вспышке» ХЛ и только после ее затухания начинает медленно восстанавливаться. Перегиб на кривой роста концентрации кислорода, по-видимому, связан с максимальной скоростью роста ХЛ в этой точке.

Полученные результаты показывают, что процесс развития ХЛ в водных растворах  $\alpha$ -аминокислот и восстанавливающих сахаров является реакцией перекисного

окисления промежуточных продуктов РМ. Предложенная методика нагревания-охлаждения позволила разделить РМ во времени на рН-зависимую стадию аминокарбонилирования, которая не требует участия кислорода и сопровождается накоплением люминофоров и активированного субстрата, и аэробную стадию свободнорадикального окисления этого субстрата, сопровождающуюся «медленной вспышкой» ХЛ и накоплением гидропероксидов. По аналогии с уже изученными разветвленно-цепными реакциями перекисного окисления в газовой [25] и неполярной жидкой фазе [26], мы предположили, что аэробная

стадия РМ, сопровождаемая «медленной вспышкой» ХЛ, может быть описана кинетическими уравнениями, характерными для цепного механизма с вырожденным разветвлением, обусловленным распадом конечного продукта – гидропероксидов.

Полученные экспериментальные результаты, показывающие возможность протекания реакции Мэйяра в физиологических условиях после кратковременной инициации, позволяют утверждать, что РМ может служить одной из важных причин возникновения продуктов перекисного окисления биоорганических молекул в живых организмах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maillard L.C. // Compt. Rend. 1912. **154**. P. 66.
2. Cerami A. // J. Am. Geriatr. Soc. 1985. **33**. P. 626.
3. Hodge J.E., Fisher B.E. Methods in Carbohydrate Chemistry. N. Y., 1963. **2**. P. 99.
4. Sell D.R., Lane M.A., Johnson W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996. **93**. P. 485.
5. Bordalen B.E. // Analytical Application of Bioluminescence and Chemiluminescence. N.Y., 1984. P. 577.
6. Kurotaki Y., Sato H., Mizugaki M. // J. Biolumin. Chemilumin. 1989. **3**. P. 13.
7. Namiki M., Oka M., Otsuka M. // J. Agri. Food. Chem. 1993. **41**. P. 1704.
8. Cadenas E. // Photochem. Photobiol. 1984. **40**. P. 823.
9. Slawinsky J. // Experientia. 1988. **44**. P. 559.
10. Adam W., Cilento G. // Ang. Chem. Int. Ed. Engl. 1983. **22**. P. 529.
11. McCapra F., Burford A. // JCS Chem. Comm. 1977. P. 874.
12. Namiki M., Hayashi T. // J. Agri. Food. Chem. 1975. **23**. P. 487.
13. Wondrak G., Pier T., Tressl R. // J. Biolumin. Chemilumin. 1995. **10**. P. 277.
14. Баскаков И.В., Воейков В.Л. // Биохимия. 1995. **61**. С. 1169.
15. Воейков В.Л., Баскаков И.В. // Биофизика. 1995. **40**. С. 1150.
16. Баскаков И.В., Воейков В.Л. // Биофизика. 1995. **40**. С. 1141.
17. Баскаков И.В., Воейков В.Л., Кафкалиц К., Налетов В.И. // Биоорган. химия. 1996. **22**. С. 39.
18. Воейков В.Л., Налетов В.И. // 2-й Съезд Биохим. общества при РАН. М., Тез. стэнд. сообщ. 1997. С. 412.
19. Naletov V.I., Voeikov V.L. // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1997. **35**. P. 90.
20. Voeikov V.L., Naletov V.I. // SPIE Proc. San Jose. CA. 1998. **3252**. P. 140.
21. Voeikov V.L., Naletov V.I. // Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. Hardbound. ISBN 0-7923-5082-0. 1998. P. 93.
22. Voeikov V.L., Naletov V.I. // First Virtual Congress about Pharmacy (IVCP) January-December 1998. Free Contribution 073 - <http://ivcp.ugr.es/073c.htm>
23. Буравлева Е.В., Налетов В.И. // V Международная конференция «Актуальные вопросы клинической фармакологии». Июль 1998. Материалы конференции. Москва. С. 13.
24. Lertsiri S., Fujimoto K., Miyazawa T. // Biochim.Biophys.Acta. 1995. **1245**. P. 278.
25. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М., 1965.
26. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
27. Seitz W.R. // Methods in Enzymology. 1978. **57**. P. 445.

Поступила в редакцию 20.03.00