

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
**ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ПЕПТИДА ГЛУТАТИОН С
ДИТИОФОСФОРНОЙ КИСЛОТОЙ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ
ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

Студентка 4 курса группы 06-612
«19» июня 2020 г.



(Уракова Е.А.)

Научный руководитель
к.ф.-м.н., доцент
«19» июня 2020 г.



(Блохин Д.С.)

Заведующий кафедрой медицинской физики
д.х.н., профессор
«19» июня 2020 г.



(Аганов А.В.)

Казань-2020

Содержание

Введение	3
1. Основы ядерной магнитной спектроскопии	4
1.1 ЯМР: ядерный магнитный резонанс	4
1.2 Магнитные свойства ядер.....	4
1.3 Химический сдвиг и мультиплетность	7
1.4 Одномерная ЯМР-спектроскопия	9
1.5 Двухмерная ЯМР спектроскопия	10
1.5.1 TOCSY (Total Correlation SpectroscopY).....	11
1.5.2 HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).....	12
2. Глутатион (GSH)	14
2.1 Общие сведения	14
2.2 Функции глутатиона	15
2.3 Глутатион с добавлением дитиофосфорной кислоты (GSH+DTP)	15
3. Экспериментальная часть	17
4. Результаты	18
4.1 Глутатион (GSH)	18
4.1.1 Получение химических сдвигов GSH.....	18
4.1.2 Анализ окисленной и восстановленной форм глутатиона	24
4.2 Глутатион с добавлением дитиофосфорной кислоты (GSH-DTP)	25
4.2.1 Стабильность дитиофосфорной кислоты	25
4.2.2 Окислительно-восстановительный баланс в GSH-DTP	27
Заключение	30
Литература	31
Приложение А	32

Введение

L- γ -Глутамил-L-цистеинил-глицин (глутатион, GSH) является преобладающим антиоксидантным олигопептидом у млекопитающих, который играет главную роль в неспецифической и ферментативной защите живых клеток от кислородных радикалов, детоксикации ксенобиотиков, поддержании и регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках. Связь дефицита глутатиона с различными метаболическими и дегенеративными процессами (старение, вирусная инфекция) хорошо известна. В то же время, повышенный уровень глутатиона часто участвует в резистентности и прогрессировании различных опухолей.

Модификация дитиофосфорными кислотами является перспективным подходом к регуляции физико-химических и биологических свойств пептидов. Добавление дитиофосфорных кислот увеличивает клеточную доступность и образует редокс-модулирующее соединение (контроль возникновения окислительного стресса) [1].

Одним из ведущих спектроскопических методов изучения молекул в растворе является ядерный магнитный резонанс (ЯМР). ЯМР-спектроскопия растворов широко применяется при исследовании динамических процессов, включая разнообразные химические и биохимические реакции, конформационные превращения биомолекул, процессы формирования третичной структуры белков, взаимодействие биомакромолекул с другими молекулами и др. За развитие методов ЯМР для определения трехмерной структуры биомакромолекул в жидкости присуждена Нобелевская премия по химии (Курт Вютрих, 2002).

Целью данной работы было изучение поведения комплекса трипептида глутатиона с добавлением дитиофосфорной кислоты в различных растворителях, а также изучение физико-химических свойств комплекса.

1. Основы ядерной магнитной спектроскопии

1.1 ЯМР: ядерный магнитный резонанс

ЯМР – это физическое явление, используемое для изучения свойств молекул материи путем облучения ядер атомов радиоволнами в магнитном поле.

Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) основано на резонансном поглощении или излучении электромагнитной энергии веществом, содержащим ядра с ненулевым спином во внешнем магнитном поле, на частоте ν (называемой частотой ЯМР), обусловленное переориентацией магнитных моментов ядер [2].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса – вид спектроскопии, которая регистрирует переходы между магнитными энергетическими уровнями атомных ядер, вызываемые радиочастотным излучением. Только ядра со спиновым квантовым числом I , отличным от «0», могут вызывать сигнал ЯМР, или быть активными в ЯМР.

Использование ЯМР:

- Химический анализ: структура и динамика молекул;
- Материаловедение: характеристики физических свойств материалов;
- Получение изображений в медицине: магнитно-резонансная томография.

1.2 Магнитные свойства ядер

Ядро состоит из элементарных частиц, называемых нейтронами и протонами, которые обладают внутренним свойством – спином. Атомные ядра с четным числом протонов и нейронов имеют нулевой спин, а все остальные атомы с нечетными числами имеют ненулевой спин. Кроме того, все молекулы с ненулевым спином имеют магнитный момент:

$$\mu = \gamma I$$

где I – квантовое число, а γ является гиromагнитным отношением, константой пропорциональности между магнитным дипольным моментом и угловым моментом, характерным для каждого ядра (таблица 1).

Таблица 1 - Гиromагнитные отношения и значения спинов для некоторых ядер

Ядро	Спин	Гиromагнитное отношение (МГц/Т)
1H	1/2	42,576
^{13}C	1/2	10,705
^{31}P	1/2	17,235
^{27}Al	5/2	11,103
^{23}Na	3/2	11,262
7Li	3/2	16,546
^{29}Si	1/2	-8,465
^{17}O	5/2	5,772
^{15}N	1/2	-4,361

Свойства ядерных спинов:

- согласно принципу неопределенности Гейзенberга, можно измерить только составляющую спина в направлении магнитного поля;
- спин со спиновым квантовым числом I может принимать $2I+1$ стабильных ориентаций в магнитном поле;
- проекция момента импульса спина на направление магнитного поля пропорциональна магнитному квантовому числу m ;
- для водорода: $I=1/2$, возможны две ориентации его проекции по отношению к оси магнитного поля: \uparrow и \downarrow (рисунок 1);
- направление суммарного магнитного момента будет осуществляться по направлению оси z и направлению магнитного поля (рисунок 2) [3].

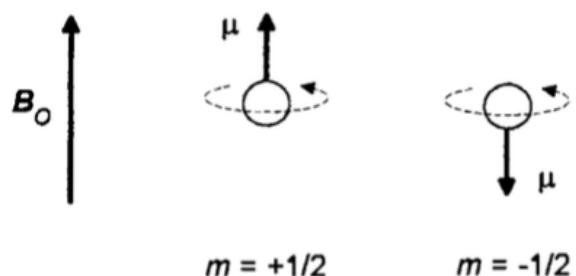


Рисунок 1 – Проекции момента импульса спина

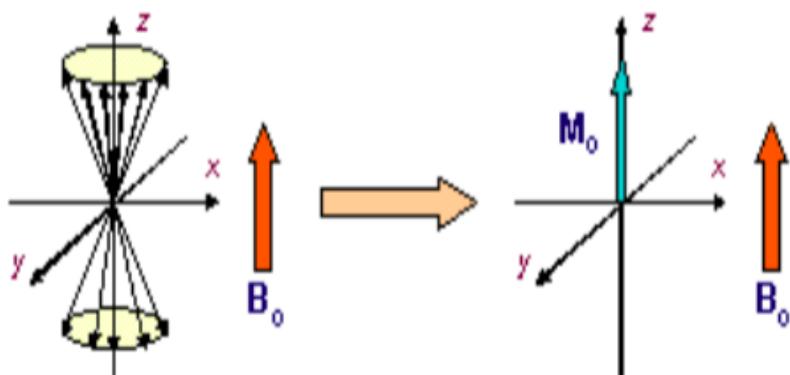


Рисунок 2 - Суммарный магнитный момент

В приложенном магнитном поле с магнитной индукцией B_0 ядро со спиновым числом I может принимать $2I + 1$ ориентаций (или занимать $2I + 1$ энергетических уровней). Количество энергии, на которое отличаются эти уровни (разность энергий уровней), возрастает с возрастанием B_0 , однако при данном значении B_0 разность энергий между двумя соседними уровнями есть величина постоянная (рисунок 3).

Разность энергий двух соседних уровней ΔE определяется выражением:

$$\Delta E = B_0 \gamma \ h / 2\pi$$

где γ – гиromагнитное отношение, постоянное для данного изотопа; B_0 – напряженность внешнего магнитного поля; h - постоянная Планка.

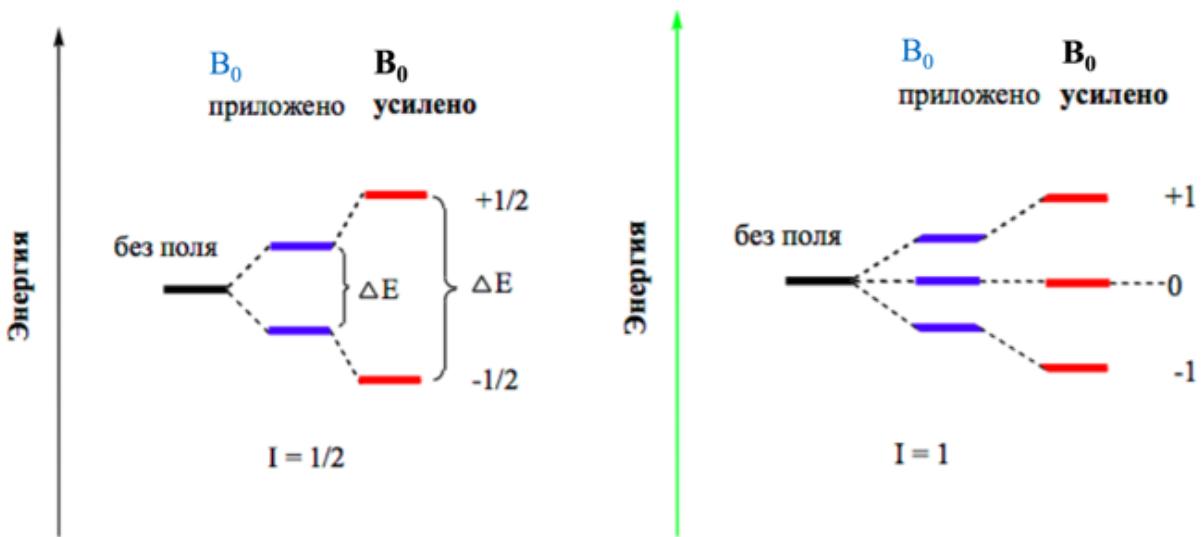


Рисунок 3 - Образование уровней энергии ядра при наложении внешнего магнитного поля B_0

1.3 Химический сдвиг и мультиплетность

Число сигналов в спектре ЯМР на ядрах водорода определяет количество ядер водорода, которые содержатся в молекуле. Положение же сигналов позволяет установить типы протонов, содержащихся в ядре: алифатические, ароматические; первичные, вторичные, третичные; бензильные, винильные, ацетиленовые; соседние с галогеном или другим атомом или группой. Именно оно определяет область спектра, в которой происходит поглощение протоном [4].

Молекула помещается в магнитное поле, в результате чего электроны врачаются таким образом, что возникает индуцированное магнитное поле (вторичное).

Циркуляция электронов относительно протона генерирует поле, противоположно направленное внешнему полю. В результате принципа суперпозиции магнитных полей, а также с учетом того, что внешнее магнитное поле сильнее сгенерированного в результате циркуляции, возникает явление, называемое экранированием протона.

В свою очередь, вращение электронов, в особенности тех, что расположены вблизи соседних ядер, способно влиять на внешнее магнитное поле, оказывающее воздействие на протон. Причем это влияние заключается либо в усилении, либо в ослаблении внешнего поля, действующего на протон. Это определяется, в большей степени, положением протона. При противоположном направлении внешнего поля и поля, генерируемого электронами, возникает явление экранирования протона, о котором уже было упомянуто выше. В случае совпадения же направлений сгенерированного электронами и внешнего магнитных полей происходит усиление внешнего поля. Это приводит к явлению деэкранизации.

Если отбросить межкомпонентные взаимодействия внутри ядра, для создания конкретного эффективного поля, способного обеспечить поглощение протоном энергии, протон в чистом виде требует приложения магнитного поля, величина напряженности которого ниже, чем для экранированного протона, но выше, чем для деэкранированного.

То есть, явления экранирования и обратного ему – деэкранирования, способны сдвигать явление поглощения в сторону сильного или слабого полей соответственно. Такие сдвиги пиков ЯМР – поглощения получили название химического сдвига.

Химический сдвиг — смещение сигнала ЯМР в зависимости от химического состава вещества, обусловленное экранированием внешнего магнитного поля электронами атомов. Возникновение внешнего магнитного поля обуславливает появление диамагнитного момента атомов, что объясняется орбитальным движением электронов. Данное движение формирует эффективные локальные токи, которые и генерируют вторичное магнитное поле. Согласно правилу Ленца, сгенерированные поля тем сильнее, чем сильнее внешние поля, обуславливающие их возникновение. Направление же их противоположно направлению внешнего поля. На основе принципа суперпозиции происходит локальное ослабление магнитного поля около ядра.

Мультиплетность M – число возможных ориентаций в пространстве спина атома и молекулы. $M = 2I+1$, I – спиновое квантовое число. Мультиплетность определяет кратность вырождения уровней атома или молекулы. $2I + 1$ квантовых состояний, соответствующих уровню энергии с заданным I , отличаются значениями проекции полного спина и характеризуются квантовым числом $M_I = I, I - 1, \dots, -I$, определяющим величину этой проекции [4, 5].

1.4 Одномерная ЯМР-спектроскопия

Принцип работы первых ЯМР-спектрометров основывался на непрерывной подаче радиочастотного излучения на образец, который помещен в постоянное магнитное поле. На данный момент запись спектров в ЯМР-спектрометрах осуществляется с помощью импульсов. Магнитные моменты ядер возбуждаются коротким мощным импульсом, после которого регистрируется сигнал, наводимый в РЧ-катушке свободно прецессирующими магнитными моментами. Этот сигнал постепенно спадает к нулю по мере возвращения магнитных моментов в состояние равновесия (этот процесс называется магнитной релаксацией). После стандартной математической процедуры, называемой Фурье-преобразованием, получаем частотное представление ЯМР-спектра (рисунок 4). Данный способ записи спектров значительно понижает уровень шумов и сокращает время эксперимента.

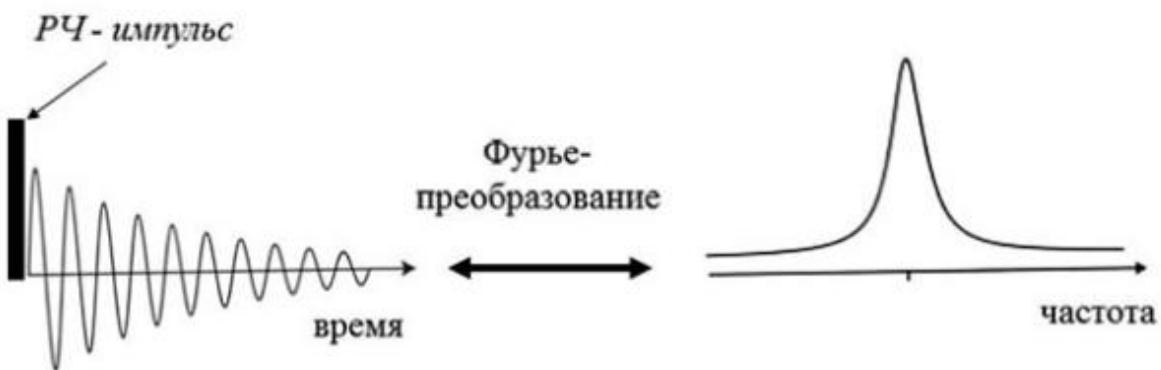


Рисунок 4 – Последовательность получения одномерного ЯМР спектра

1.5 Двухмерная ЯМР спектроскопия

Анализ сложных органических молекул с помощью одномерных спектров может стать очень затруднительной задачей, поэтому для облегчения данной задачи стали проводить двухмерное фурье-преобразование сигнала (получение функций двух временных переменных). Появление двухмерных методик ЯМР спектроскопии значительно облегчило определение химической и пространственной структуры сложных органических молекул.

В отличие от одномерного эксперимента, в котором интенсивность поглощения зависит от одной частоты, в двухмерном ЯМР эксперименте сигнал является уже функцией двух переменных: времени t_1 и t_2 . Если в дальнейшем произвести Фурье-преобразование по этим двум величинам, то получится спектр, являющийся функцией уже двух частот. Наличие пика, определяющегося уже двумя частотами, показывает, что спины взаимодействуют между собой через химическую связь посредством спин-спинового взаимодействия или через диполь-дипольный механизм, т.е. через пространство.

Гомоядерные двухмерные методы:

- COSY (COrelationSpectroscopY);
- ECOSY (ExclusiveCOrelationSpectroscopY);
- TOCSY (TotalCorrelationSpectroscopY).

Гетероядерные двумерные методы:

- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation);
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

Межпространственные двумерные методы:

- NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY);
- ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY).

1.5.1 TOCSY (Total Correlation SpectroscopY)

Двумерный эксперимент TOCSY обычно используется для исследования больших молекул с множеством связей, таких как пептиды, белки, олигосахариды и полисахариды.

Особенности метода:

- разделение ЯМР-спектра на множество простых подспектров отдельных спиновых систем;
- сигналы от прямых связей и от соседних (рисунок 5).

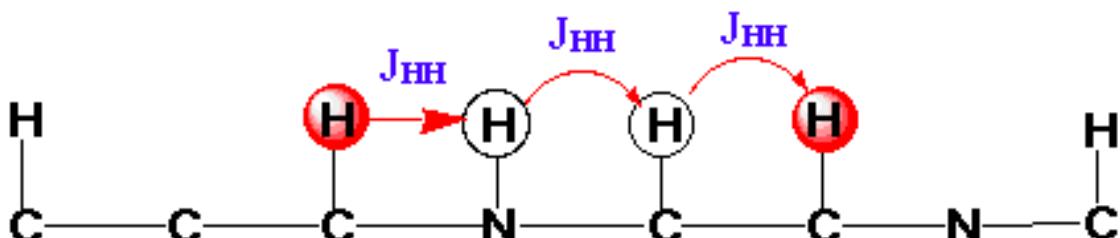


Рисунок 5 – Сигналы в двумерном эксперименте TOCSY

Импульсная последовательность данного эксперимента приведена на рисунке 6.

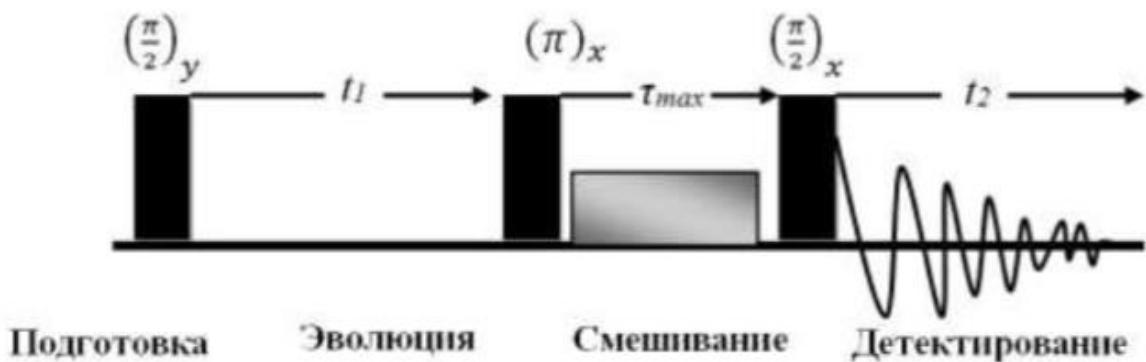


Рисунок 6 – Импульсная последовательность двумерного ЯМР-эксперимента TOCSY

1.5.2 HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

Гетероядерная одноквантовая корреляция - эксперимент по наблюдению корреляции между химическими сдвигами протонов и химическими сдвигами ядер X (как правило, ^{13}C или ^{15}N) через прямое спин-спиновое взаимодействие между ядрами. Детектируемым ядром в данной методике являются протоны, что позволяет существенно сократить время эксперимента, по сравнению с традиционным гетерокорреляционным экспериментом, за счет более высокой чувствительности [6].

Импульсная последовательность данного эксперимента приведена на рисунке 7.

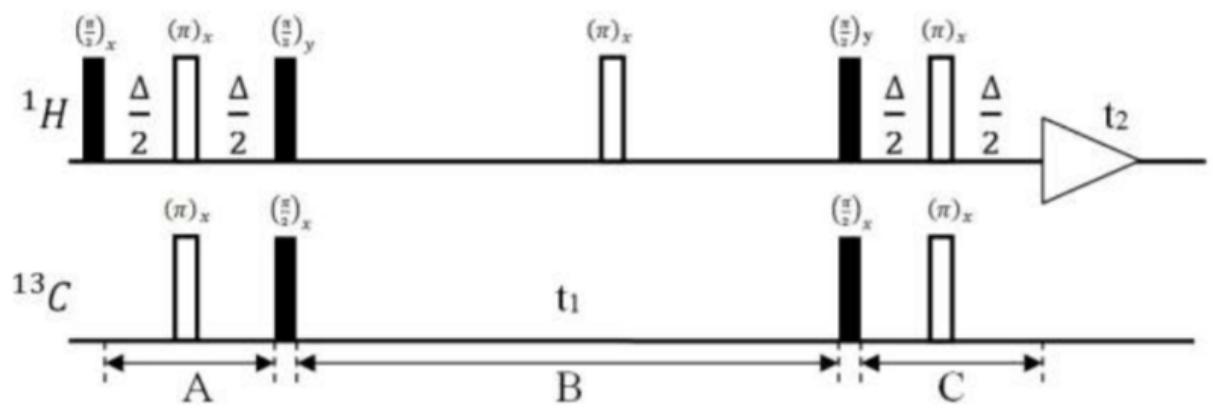


Рисунок 7 – Импульсная последовательность двумерного ЯМР-эксперимента HSQC

2. Глутатион (GSH)

2.1 Общие сведения

Глутатион – пептид, который состоит из трех аминокислотных остатков: глутаминовая кислота, цистеин, глицин (рисунок 8).

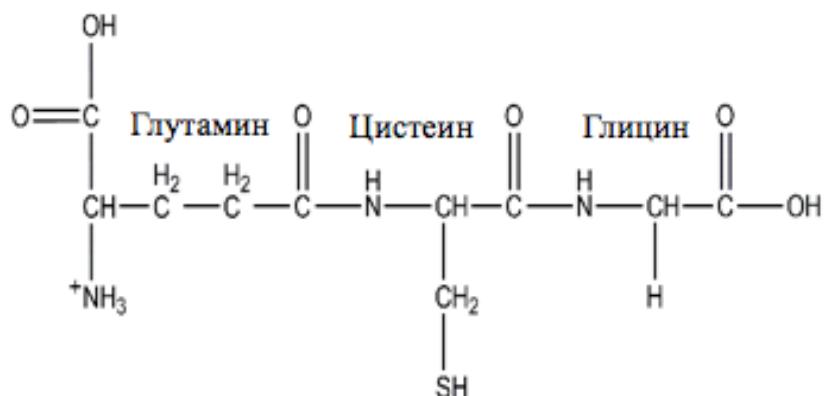


Рисунок 8- Структурная формула глутатиона

Глутатион не является незаменимым питательным веществом, поскольку может быть синтезирован в организме из L-цистеина, L-глутаминовой кислоты и глицина. Сульфидрильная (тиоловая) группа (SH) цистеина служит в качестве донора протонов и отвечает за биологическую активность глутатиона. Цистеин является ограничивающим скорость фактором в клеточном синтезе глутатиона, поскольку эта аминокислота относительно редко встречается в пищевых продуктах.

Строение молекулы глутатиона представлено на рисунке 9.

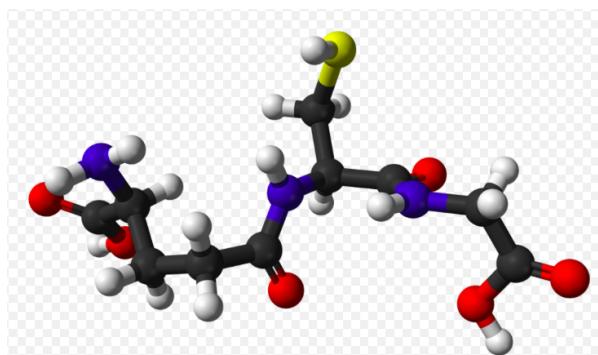


Рисунок 9 - Строение молекулы глутатиона

2.2 Функции глутатиона

Глутатион выполняет несколько функций:

- участвует в синтезе лейкотриенов и является кофактором фермента глутатионпероксидазы;
- участвует в реакции детоксификации метилглиоксала, токсичного побочного продукта метаболизма;
- является субстратом реакций конъюгации и восстановления, катализируемых глутатион-S-трансферазой в цитозоле, микросомах и в митохондриях;
- отвечает за стабилизацию окислительных процессов;
- играет важную роль в метаболизме железа;
- синтез и репарация ДНК, синтез белка, транспорт аминокислот, активация ферментов;
- регулирование азотооксидного цикла;
- эндогенный антиоксидант.

2.3 Глутатион с добавлением дитиофосфорной кислоты (GSH+DTP)

Главной особенностью добавления дитиофосфорной кислоты к глутатиону является увеличение клеточной доступности и образование редокс-модулирующего соединения (контроль возникновения окислительного стресса).

Химическая формула комплекса глутатиона с дитиофосфорной кислотой представлена на рисунке 10.

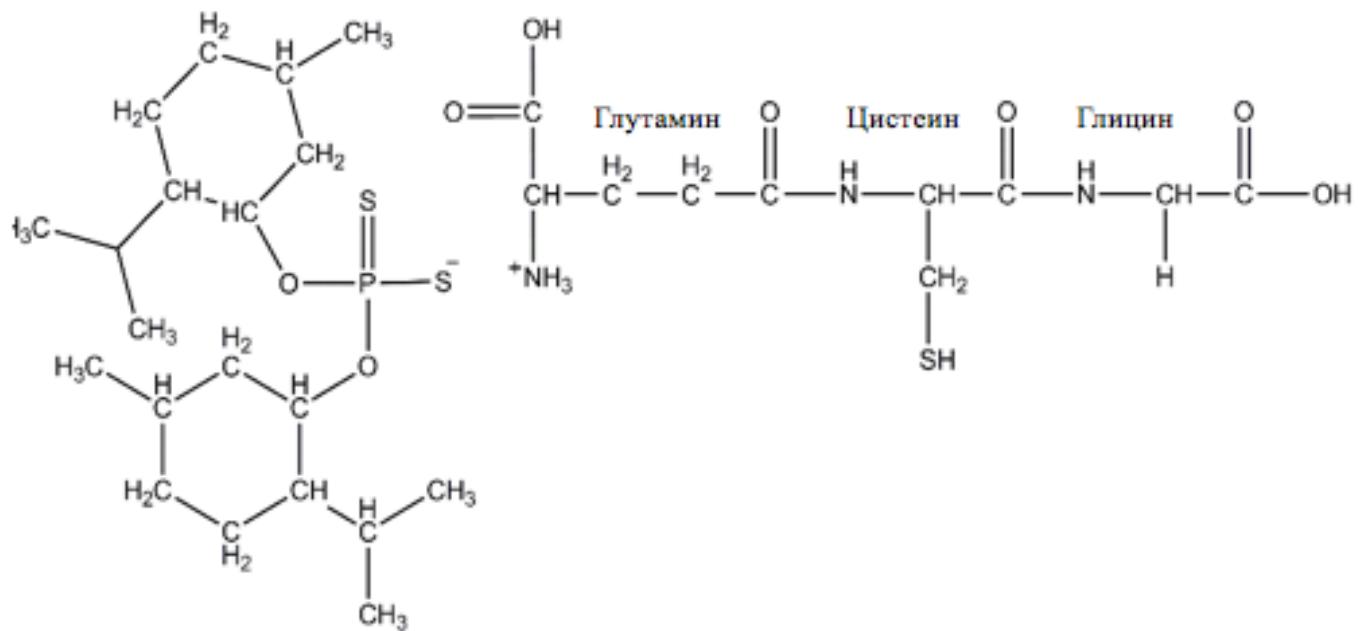


Рисунок 10 – Химическая формула комплекса глутатиона с дитиофосфорной кислотой

3. Экспериментальная часть

Метод изучения образцов – спектроскопия ЯМР высокого разрешения. Регистрацию одномерных и двумерных спектров ЯМР проводили на спектрометрах Avance II-500 (Bruker) и Avance III HD 700 (700 МГц на ядрах ^1H) с четырехканальным криодатчиком QCI (^1H , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) (Оборудование ФЦКП ФХИ К(П)ФУ). Данные спектрометры позволяют производить регистрацию спектров ЯМР в растворах, гелеобразных и твердых порошкообразных органических веществах на ядрах ^1H (500,0 МГц), ^{13}C (125,2 МГц), ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P . Спектрометры работают в режиме внутренней стабилизации по линии резонанса ^2H . При записи одномерных спектров ЯМР ^1H и ^{31}P использовали 90° импульсы и задержки между импульсами 2 с; ширина спектра была 14 м.д.; число накоплений от 10. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C трипептида GSH в восстановленной и окисленной формах использовали 2D ^1H - ^{13}C HSQC и TOCSY эксперименты. Для анализа стабильности образца в различных растворителях использовали одномерные эксперименты по ядрам ^{31}P . Растворы для эксперимента готовились перед измерениями. Исследуемые образцы представляли собой порошок трипептида GSH и порошок трипептида GSH с добавлением DTP. Концентрации образцов в растворах 0,5% - 0,6% (весовых) при записи ЯМР спектров.

4. Результаты

4.1 Глутатион (GSH)

4.1.1 Получение химических сдвигов GSH

Зарегистрировали одномерный ^1H ЯМР спектр глутатиона восстановленного в воде (рисунок 11).

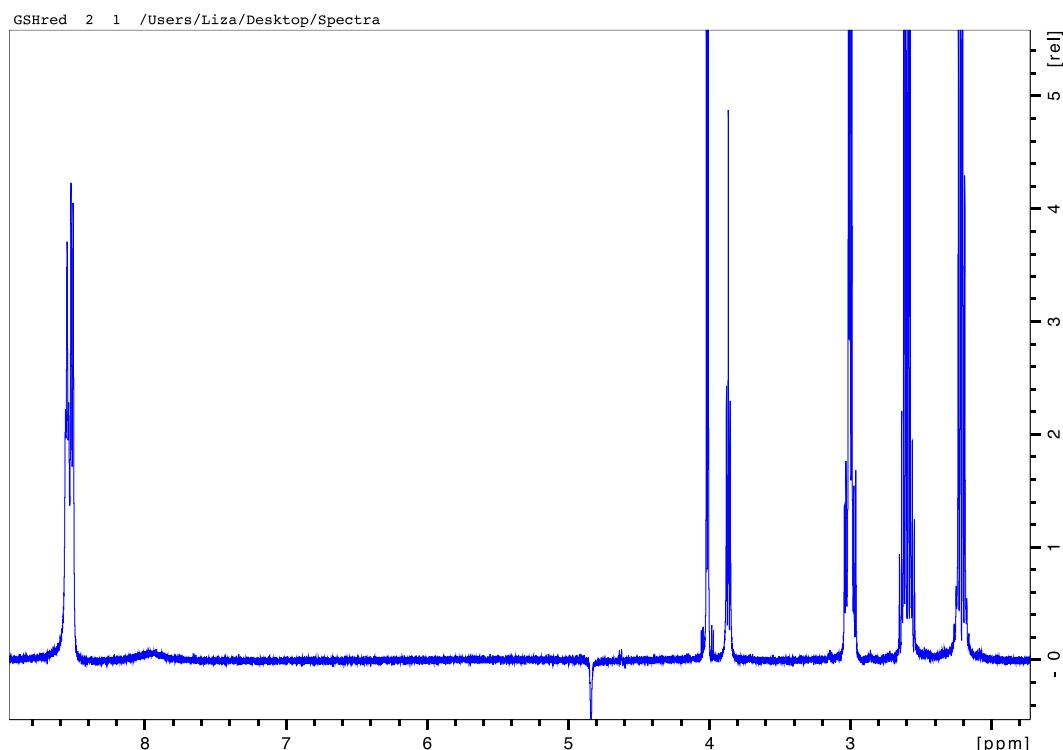


Рисунок 11 – одномерный ^1H ЯМР спектр глутатиона восстановленного в $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ (90%+10%), $T=298$ К

Для соотнесения полученных сигналов были использованы литературные данные [7] (рисунок 12).

Typical proton chemical shifts for amino acids within a protein.

type	HN	HA	HB	other
gly	8.0	4.2,3.8		
ala	8.0	4.4	1.4b	
val	8.0	4.4	2.0b	1.0,0.9g
ser	8.0	4.5	3.7,3.6b	
thr	8.0	4.5	4.4b	1.2g
cys	8.0	4.5	3.3,3.1b	
asp	8.0	4.6	2.5,2.3b	
asn	8.0	4.6	2.5,2.3b	amine: 6.9,7.6
glu	8.0	4.5	2.2,2.1b	2.3,2.2g
gln	8.0	4.5	2.2,2.1b	2.3,2.2g amine: 6.9,7.6
ile	8.0	4.3	1.0b 0.9g(methyl)	1.2,1.1g 1.0d(methyl)
leu	8.0	4.4	1.7,1.6b	1.6g 1.0d,0.9d
lys	8.0	4.4	1.6,1.7b	1.5,1.4g 1.7,1.6d 3.0,3.1e NH ₃ :6.9
arg	8.0	4.4	1.6,1.7b	1.5,1.4g 1.7,1.6d 3.3,3.2e NH:7.1
met	8.0	4.5	2.0,2.1b	2.6,2.5g methyl: 2.2
pro		4.5	2.2,2.0b	2.1,2.0g 3.7,3.6d
phe	8.0	4.5	3.0,2.8b	ring: H-C (3) 6.5 to 7.6
tyr	8.0	4.5	3.0,2.8b	ring: H-C (2) 6.6 to 7.4
trp	8.0	4.5	3.1,2.9b	ring: H-C (5) 6.5 to 7.9, NH:10.0
his	8.0	4.5	3.2,3.0b	ring: H-C (2) 6.5 to 8.5

Chemical shifts may vary by as much as approximately ± 1.5 , and sometimes more, depending on local structure.

Sometimes OH proton of Thr and Ser may be observed near 5.6 ppm.

Рисунок 12 - диаграмма химических сдвигов в спектрах ¹H ЯМР для аминокислотных остатков

У глутатиона три амидные группы: NH₂ глутаминовой кислоты Glu, NH цистеина Cys, NH глицина Gly. На протонном спектре (рисунок 13) в области амидных групп наблюдаются два сигнала: триплет (8,55 м.д.) и дублет (8,52 м.д.). У глутаминовой кислоты группа NH₂ будет участвовать в

обменных процессах с водой и на протонном спектре сигнала от неё не будет. Значит наблюдаемые сигналы 8,55 м.д. и 8,52 м.д. будут принадлежать цистеину и глицину. Проанализируем мультиплетность NH сигналов у этих аминокислотных остатков. У глицина для группы NH соседняя группа Нα содержит два атома водорода (CH_2), значит на протонном спектре для NH мы должны наблюдать триплет. У цистеина альфа группа содержит только один атом водорода. Следовательно, сигнал от NH группы должен представлять из себя дублет. Учитывая выше сказанное, можем соотнести сигнал ^1H ЯМР спектра 8,55 м.д. с NH глицина, а 8,52 м.д. NH цистеина (Таблица 2).

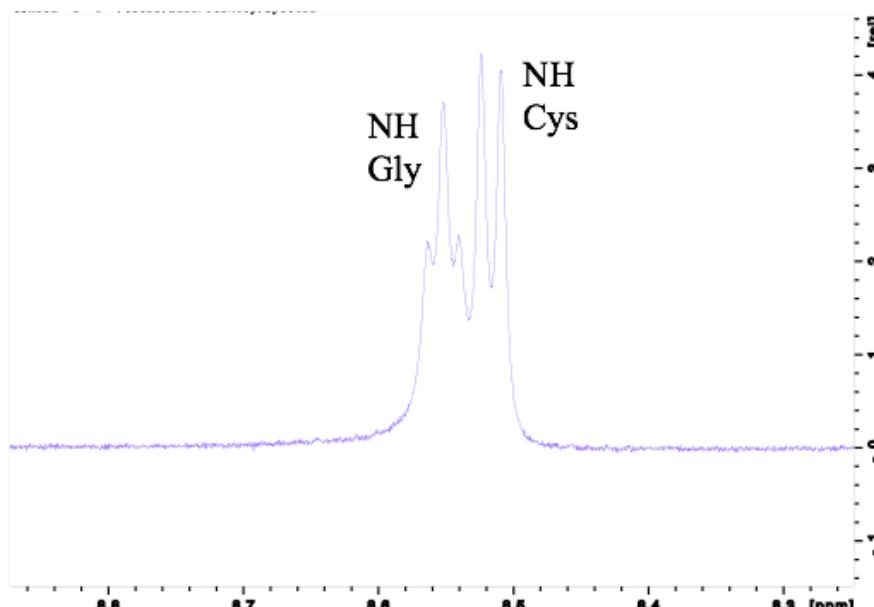


Рисунок 13 - одномерный ^1H ЯМР спектр глутатиона восстановленного в $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ (90%+10%), $T=298$ К, сигналы от -NH- групп

Таблица 2 - Химические сдвиги для группы -NH-

NH	NH
Cys	Gly
8,52	8,55

Для нахождения химических сдвигов для алифатических групп будем использовать двумерный ^1H - ^1H TOCSY спектр ЯМР (рисунок 14).

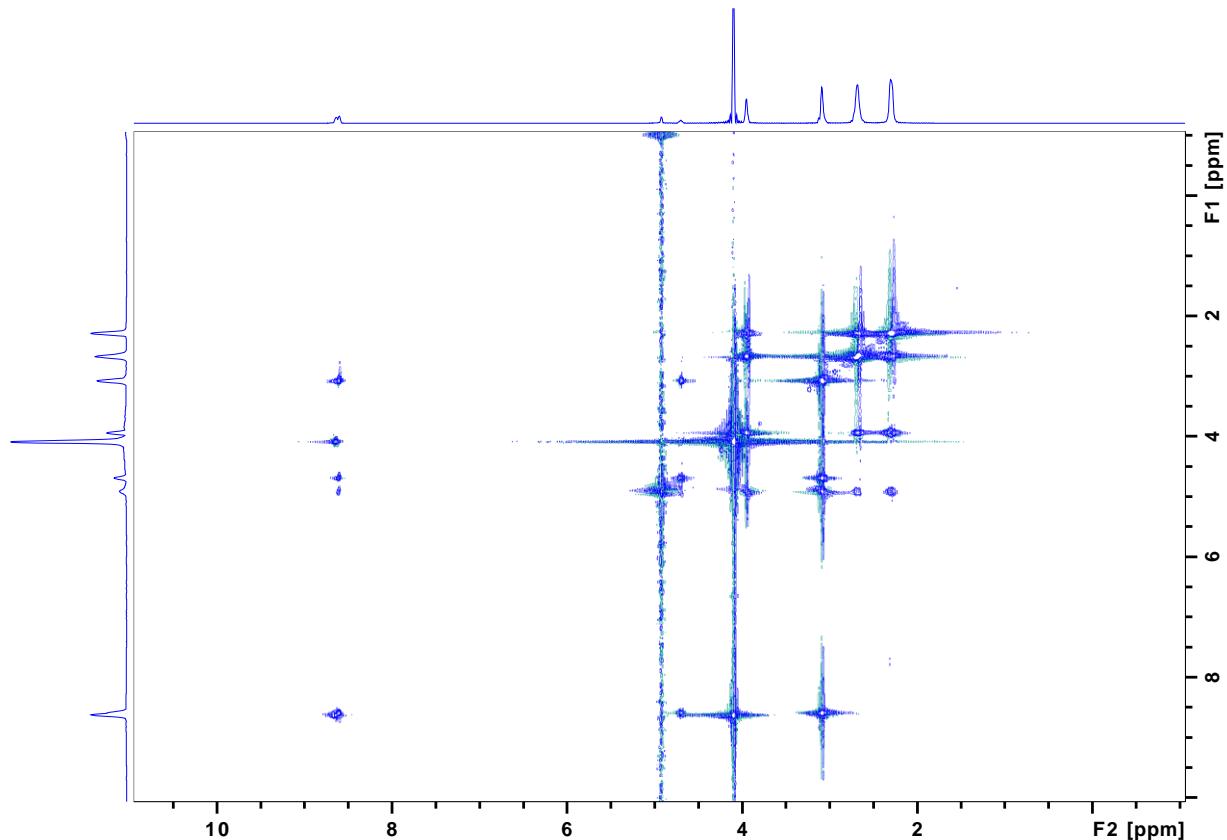


Рисунок 14 – двумерный ^1H - ^1H TOCSY спектр восстановленного глутатиона в $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ (90%+10%), $T=298$ К

Так как глутатион имеет три аминокислотных остатка (глутаминовая кислота, цистеин и глицин), рассмотрим каждый из них.

Алифатическая группа глицина - $\text{H}\alpha$ (CH_2). Зная химический сдвиг амидной группы глицина, мы можем с помощью TOCSY спектра определить химический сдвиг $\text{H}\alpha$ группы (рисунок 15).

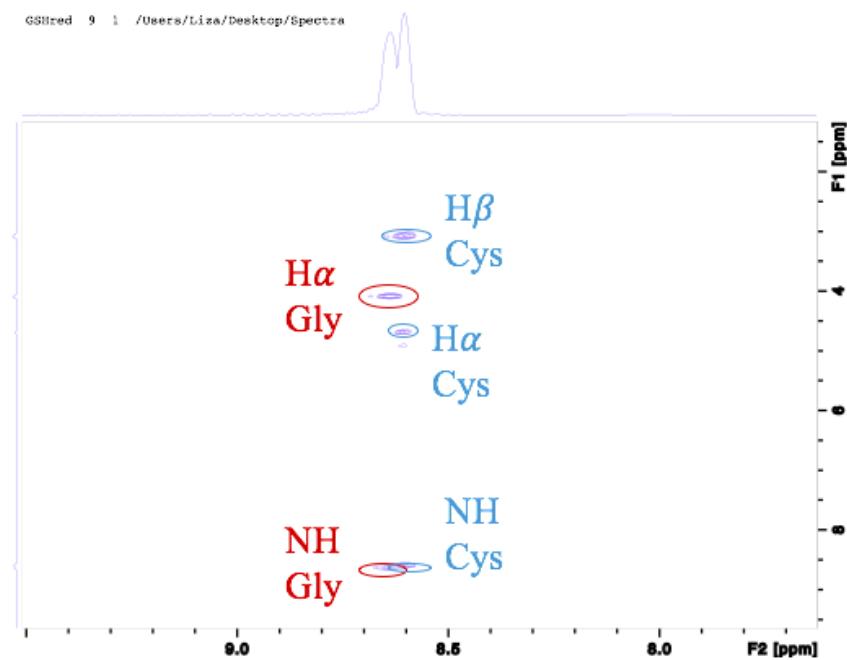


Рисунок 15 – фрагмент двумерного ^1H - ^1H TOCSY спектра восстановленного глутатиона

Алифатические группы цистеина: $\text{H}\alpha(\text{CH})$, $\text{H}\beta(\text{CH}_2)$. Для группы $\text{H}\beta$ будут две соседние группы: $\text{H}\alpha$ содержит один атом водорода (CH) и SH содержит один атом водорода. На спектре мы должны наблюдать триплет, что мы и видим (рисунок 16). Сигналы по бокам триплета – возможное окисление образца.

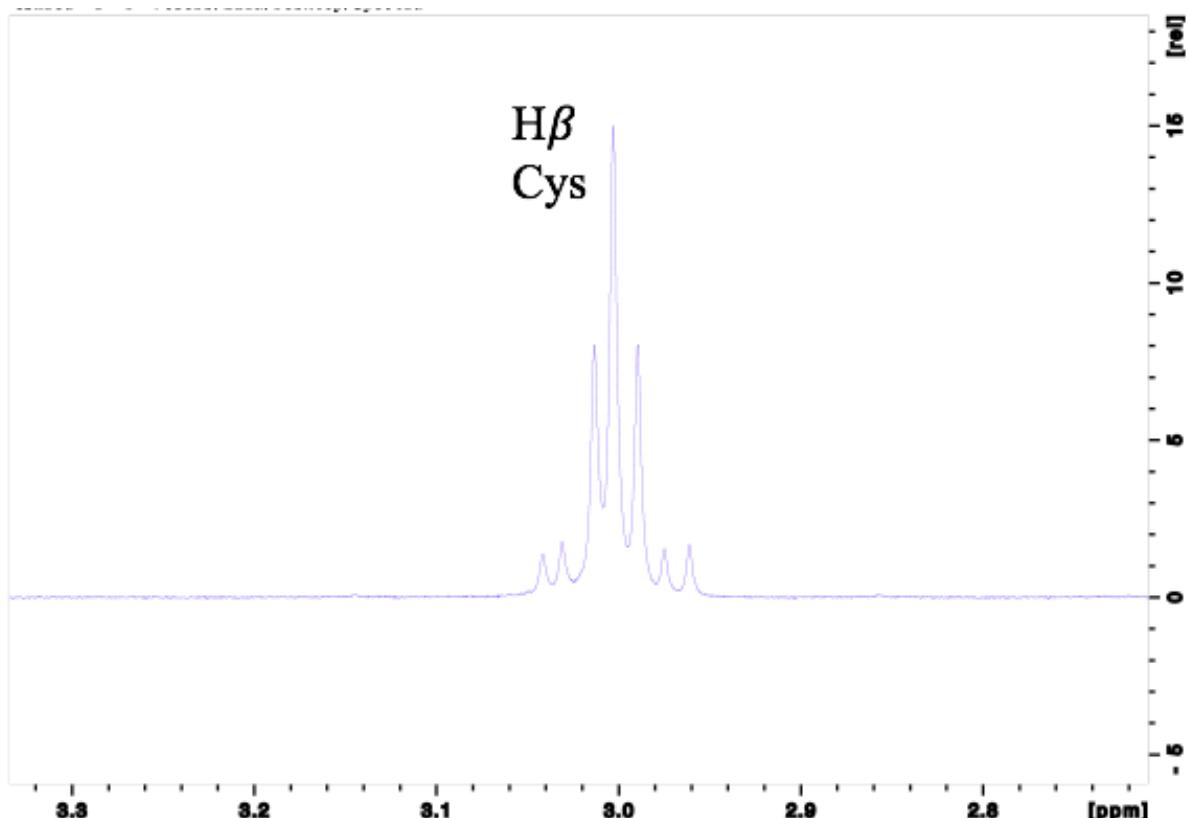


Рисунок 16 – Фрагмент одномерного ^1H ЯМР спектра глутатиона восстановленного в $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$ (90%+10%), $T=298$ К

На одномерном спектре мы не видим сигнал от $\text{H}\alpha$ группы из-за того, что он находится вблизи сигнала от воды. Поэтому мы нашли данный сигнал с помощью TOCSYспектра, зная химический сдвиг амидной группы цистеина (рисунок 15).

Алифатические группы глутаминовой кислоты: $\text{H}\alpha(\text{CH})$, $\text{H}\beta(\text{CH}_2)$, $\text{H}\gamma(\text{CH}_2)$. На протонном спектре в области $\text{H}\gamma$ групп мы наблюдаем только один сигнал (2,22 м.д.) (рисунок 11). В области $\text{H}\alpha$ остался один сигнал (3,86 м.д.) и для $\text{H}\beta$ группы также остался только один сигнал (2,61 м.д.).

Данные по всем химическим сдвигам представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Химические сдвиги для групп $-\text{CH}-$ и $-\text{CH}_2-$

CH $\text{Glu, H}\alpha$	CH_2 $\text{Glu, H}\beta$	CH_2 $\text{Glu, H}\gamma$	CH $\text{Cys, H}\alpha$	CH_2 $\text{Cys, H}\beta$	CH_2 $\text{Gly, H}\alpha$
3,86	2,61	2,22	4,86	3,00	4,01

4.1.2 Анализ окисленной и восстановленной форм глутатиона ---

Реперной точкой для отличия окисленной и восстановленной формы глутатиона с помощью ЯМР спектроскопии может быть использована β -группа цистеинового остатка. В окисленной форме глутатиона между SH-группами цистеина образуется дисульфидная связь. В следствие этого, наблюдается различие в химических сдвигах цистеина С β группы: для GSH (восстановленная форма глутатиона) С β – 25.6 ppm, для GSSG (окисленная форма глутатиона) С β – 38.7 ppm (рисунок 17).

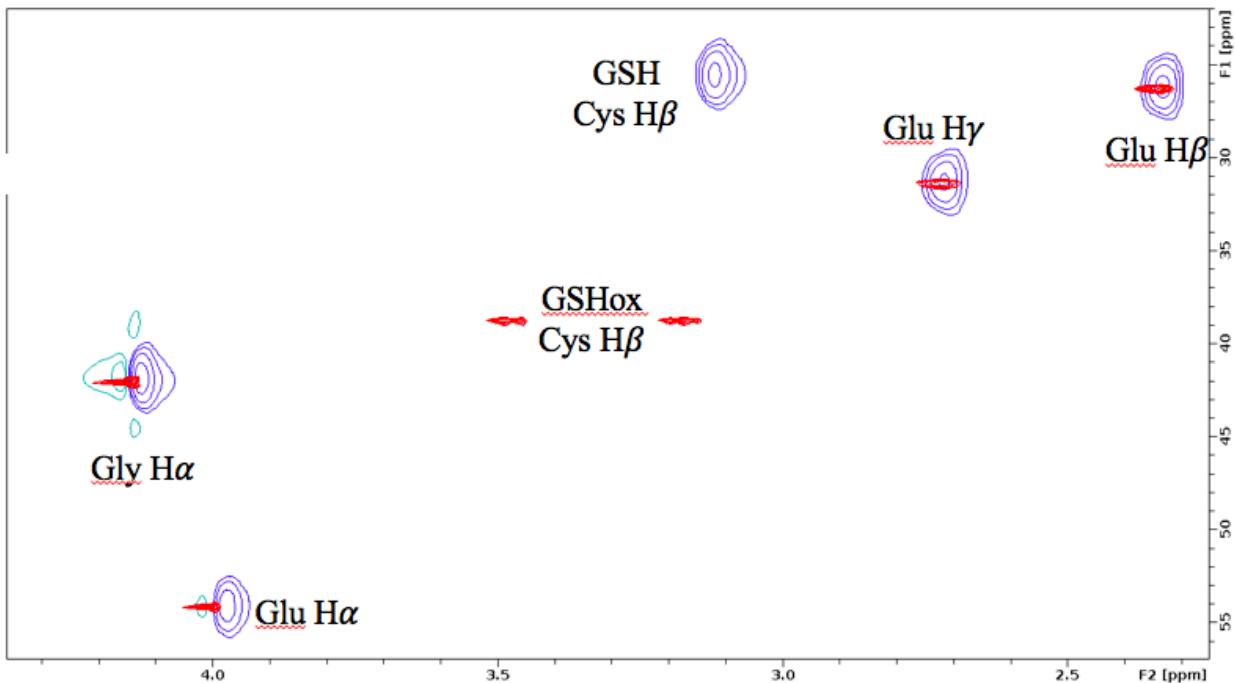


Рисунок 17 – ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР спектр окисленной (красные пики) и восстановленной (синие пики) формы глутатиона

Также образование дисульфидной связи приводит к тому, что протоны Н β группы цистеина становятся неэквивалентными и от каждого протона, входящего в СН₂ группу, наблюдается отдельный сигнал (рисунок 18).

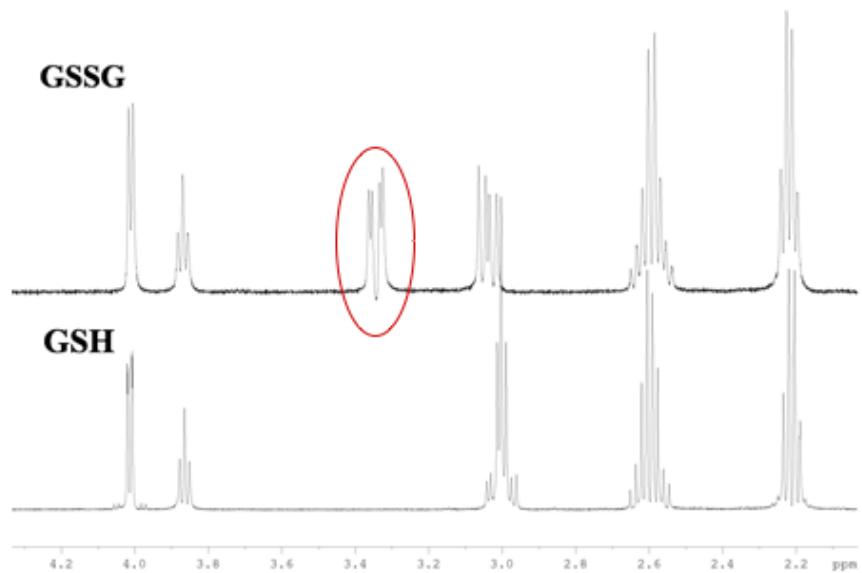


Рисунок 18 – Одномерные ^1H ЯМР спектры глутатиона в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах

Основываясь на этих данных, мы можем контролировать процесс образования дисульфидных связей глутатиона.

4.2 Глутатион с добавлением дитиофосфорной кислоты (GSH-DTP)

4.2.1 Стабильность дитиофосфорной кислоты

Далее был исследован глутатион в комплексе с дитиофосфорной кислотой (DTP). Первой задачей стало стабильность DTP. Проводился подбор растворителя с менее интенсивной диссоциацией DTP до ортофосфорной кислоты. Для контроля стабильности DTP были использованы интегральные данные из одномерных ^{31}P ЯМР спектров глутатиона в комплексе с дитиофосфорной кислотой. DTP имеет химический сдвиг по ядрам ^{31}P равный 106,9 ppm, а ортофосфорная кислота – 0 ppm (рисунок 19).

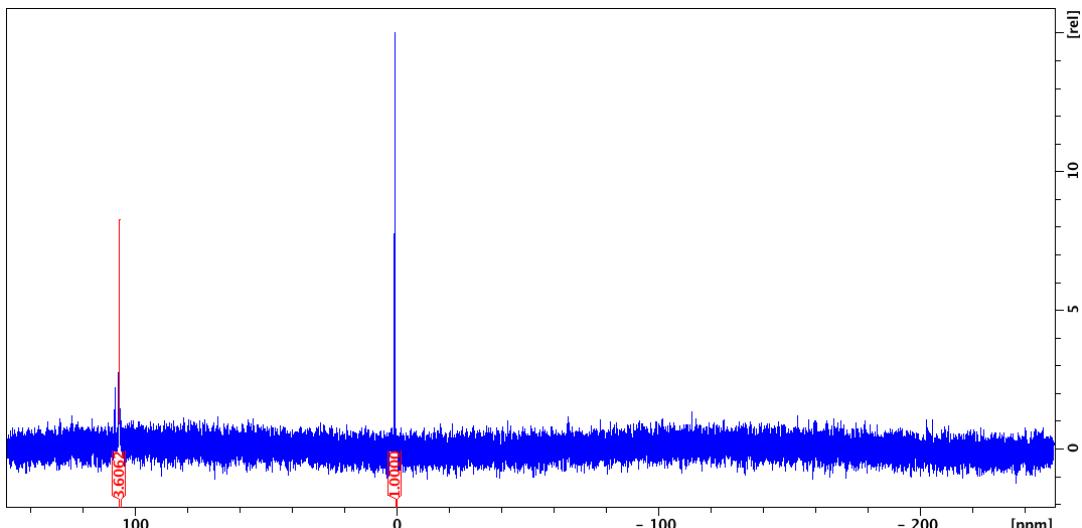


Рисунок 19 - Одномерный ^{31}P ЯМР спектр GSH-DTP в растворителе-
богатый буфер+ D_2O

Одномерные ^{31}P ЯМР спектры GSH-DTP, которые были получены в результате экспериментов для всех исследуемых растворителей, представлены в Приложении (рисунок 1-6).

В таблице 4 приведены соотношения содержания DTP и ортофосфорной кислоты, определенные из анализа интегральной интенсивности сигналов одномерных ^{31}P ЯМР спектров.

Таблица 4 – Данные о диссоциации дитиофосфорного остатка, полученные из одномерных ^{31}P ЯМР спектров

Раствор	Содержание ортотиофосфорной кислоты	Содержание дитиотиофосфорной кислоты
Образец: GSH-DTP Растворитель: $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$	68,5%	31,5%
Образец: GSH-DTP Растворитель: PBS+ D_2O	88%	12%
Образец: GSH-DTP Растворитель: DPC+ $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$	59%	41%
Образец: GSH-DTP Растворитель: боратный буфер+ D_2O	21,7%	78,3%

Исходя из полученных данных можно утверждать, что наименьшая диссоциация дитиотиофосфорной кислоты наблюдается в боратном буфере с $\text{pH}=7,4$.

4.2.2 Окислительно-восстановительный баланс в GSH-DTP

Глутатион содержит три амидные группы: NH_2 глутаминовой кислоты Glu, NH цистеина Cys, NH глицина Gly. На протонном спектре (рисунок 20) в области амидных групп наблюдаются два сигнала: тройной (8,13 ppm) и дублет (8,37 ppm) (аналогичная картина наблюдается на спектре окисленной формы глутатиона). У глутаминовой кислоты группа NH_2 будет участвовать в обменных процессах с водой и на протонном спектре сигнала от неё не будет. Наблюдаемые сигналы 8,13 ppm и 8,37 ppm будут принадлежать

глицину и цистеину, соответственно.

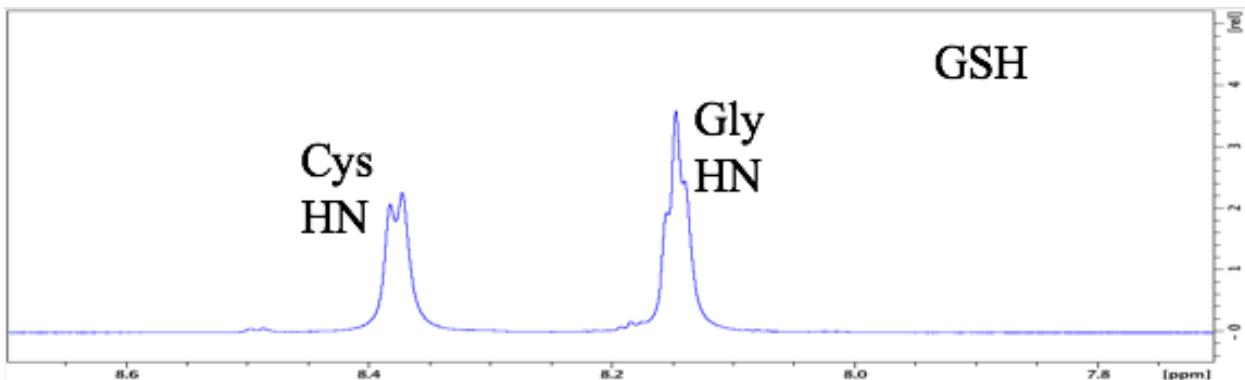


Рисунок 20 – Фрагмент одномерного ^1H ЯМР спектра GSH (востановленная форма глутатиона) в растворителе- PBS+D₂O (сигналы от амидных групп)

Добавление DTP привело к раздвоению сигналов каждой амидной группы (рисунок 21), т.е. в области амидных групп модифицированного образца наблюдаются четыре сигнала: два триплета (8,48 ppm и 8,44 ppm) и два дублета (8,40 ppm и 8,51 ppm).

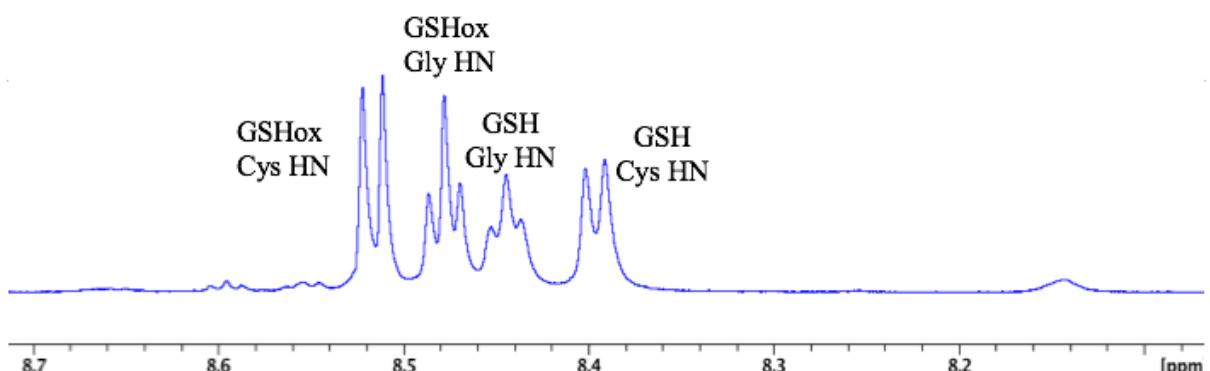


Рисунок 21 – Фрагмент одномерного ^1H ЯМР спектра GSH-DTP в растворителе- PBS+D₂O (сигналы от амидных групп)

Исходя из этого, можем предположить, что добавление DTP к глутатиону повлияло на окислительно-восстановительный процесс образца, и это привело к раздвоению сигналов в амидных группах. Поэтому мы можем сделать вывод, что на рисунке 21 в области амидных групп мы наблюдаем

два сигнала (дублет, триплет) от окисленной формы глутатиона и два сигнала (дублет, триплет) от восстановленной формы глутатиона. С течением времени спектры не изменялись, что говорит о стабильности системы глутатион-дитиофосфорная кислота. Из анализа интегральной интенсивности NH-групп на протонном спектре (рисунок), следует, что окисленная и восстановленная форма присутствуют в системе в соотношение 1:1, примерно.

Заключение

1. Экспериментально подобран растворитель для образца GSH-DTP, в котором наблюдается наименьшая диссоциация дитиофосфорной кислоты – боратный буфер ($\text{pH}=7,4$).
2. Показана возможность использования значения химического сдвига углерода бета-группы цистеина Cys Сβ для контроля окисленной и восстановленной формы глутатиона.
3. Добавление DTP к глутатиону повлияло на окислительно-восстановительный процесс образца, в следствии чего, мы одновременно наблюдаем две формы образца: окисленная и восстановленная.

Литература

1. Akhmadishina, R.A. Glutathione salts of O,O- diorganyldithiophosphoric acids: Synthesis and study as redox modulating and antiproliferative compounds [Text] / R.A. Akhmadishina, E.V. Kuznetsova, G.R. Sadrieva, L.R. Sabirzyanova, I.S. Nizamov, G.R. Akhmedova, I.D. Nizamov, T.I. Abdullin // Peptides. – 2018. – V. 99 – P.179 – 188.
2. Jesse, R. Proton NMR [Text] / R. Jesse, C. Ronald . – VSD, 2012. – 272 p.
3. Блюмих, Б. Основы ЯМР [Текст] / Б. Блюмих; пер. с англ. Н. Е. Агаповой. – М: Техносфера, 2007. – 152 с.
4. Гюнтер, Х.Г Введение в курс спектроскопии ЯМР [Текст] / Х.Г Гюнтер. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 478 с.
5. Карагаева, Ф.Х. Спектроскопия ЯМР ^1H и ^{13}C в органической химии [Текст] / Ф.Х. Карагаева, В.В. Клочков. – Казань: КГУ, 2007. – 129 с.
6. Дероум, Э.А. Современные методы ЯМР для химических исследований [Текст] / Э.А. Дероум. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1992. – 403 с.
7. Wuthrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids [Text] / K. Wuthrich. – Wiley-Interscience, 1986. – 192 с.

Приложение А

Одномерные ^{31}P ЯМР спектры GSH-DTP, которые были получены в результате экспериментов для всех исследуемых растворителей:

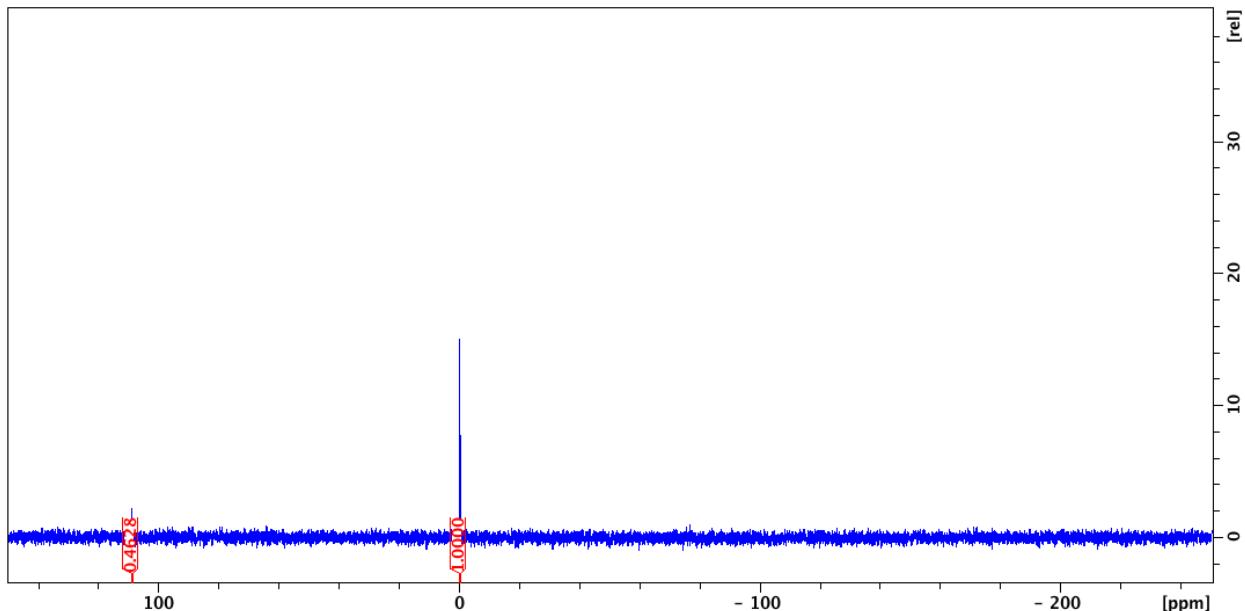


Рисунок А1 – Одномерный ^{31}P ЯМР спектр модифицированного образца GSH-DTP в растворителе- $\text{H}_2\text{O}+\text{D}_2\text{O}$

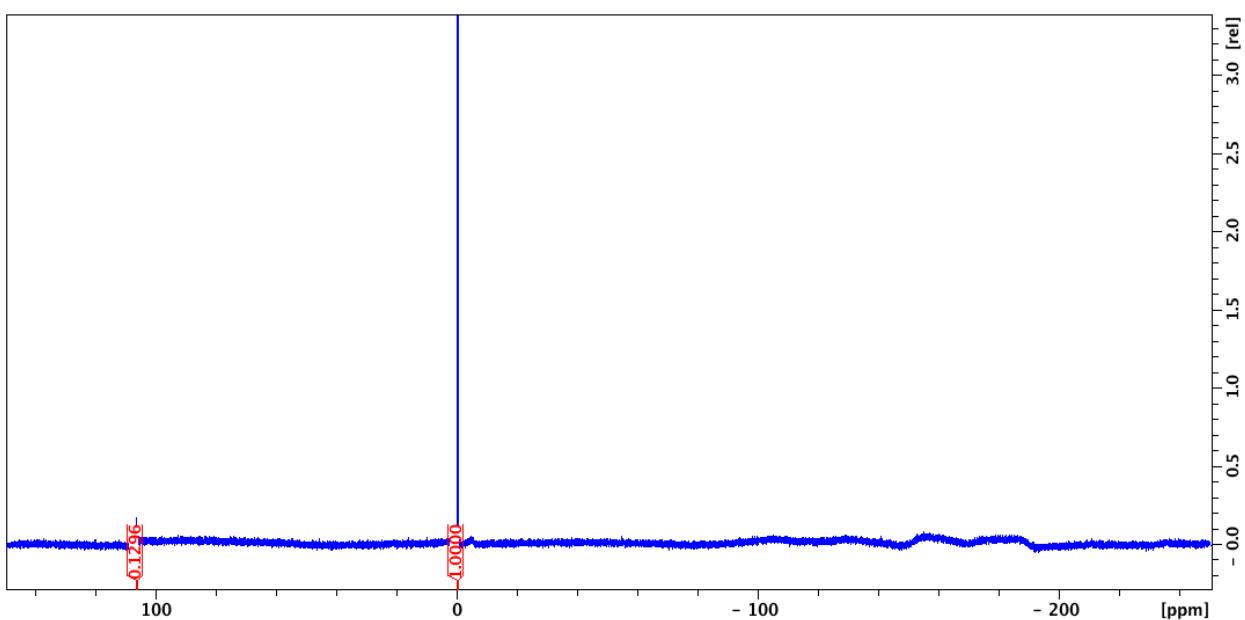


Рисунок А2 – Одномерный ^{31}P ЯМР спектр модифицированного Образца GSH-DTP в растворителе- PBS+D₂O

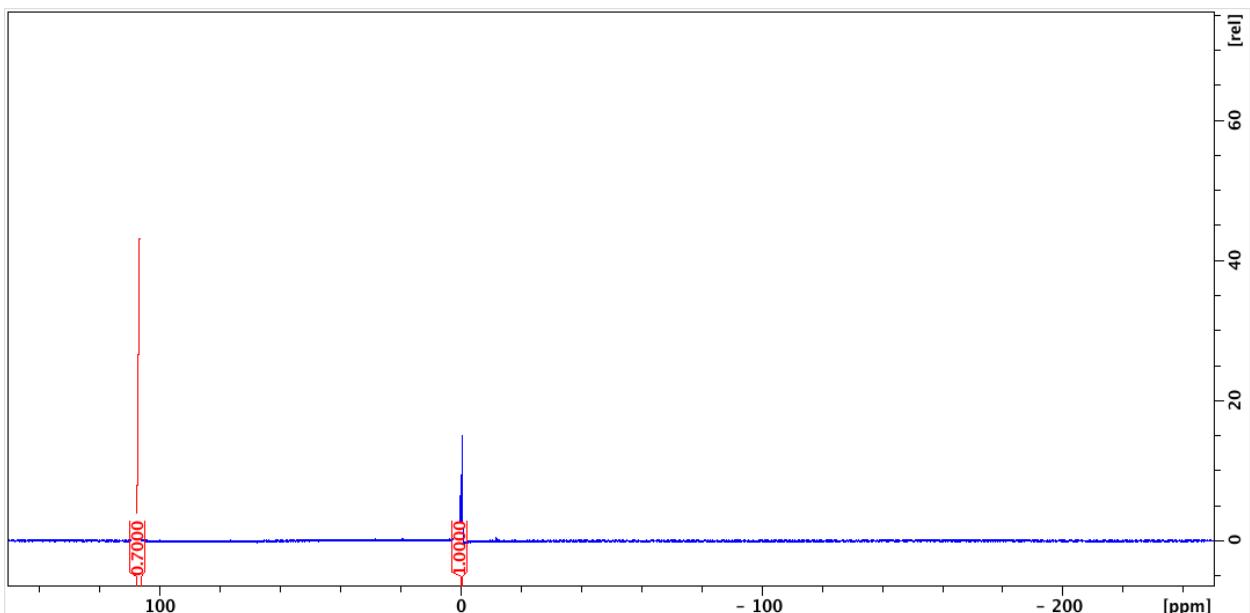


Рисунок А3 – Одномерный ^{31}P ЯМР спектр модифицированного образца GSH-DTP в растворителе- DPC+H₂O+D₂O

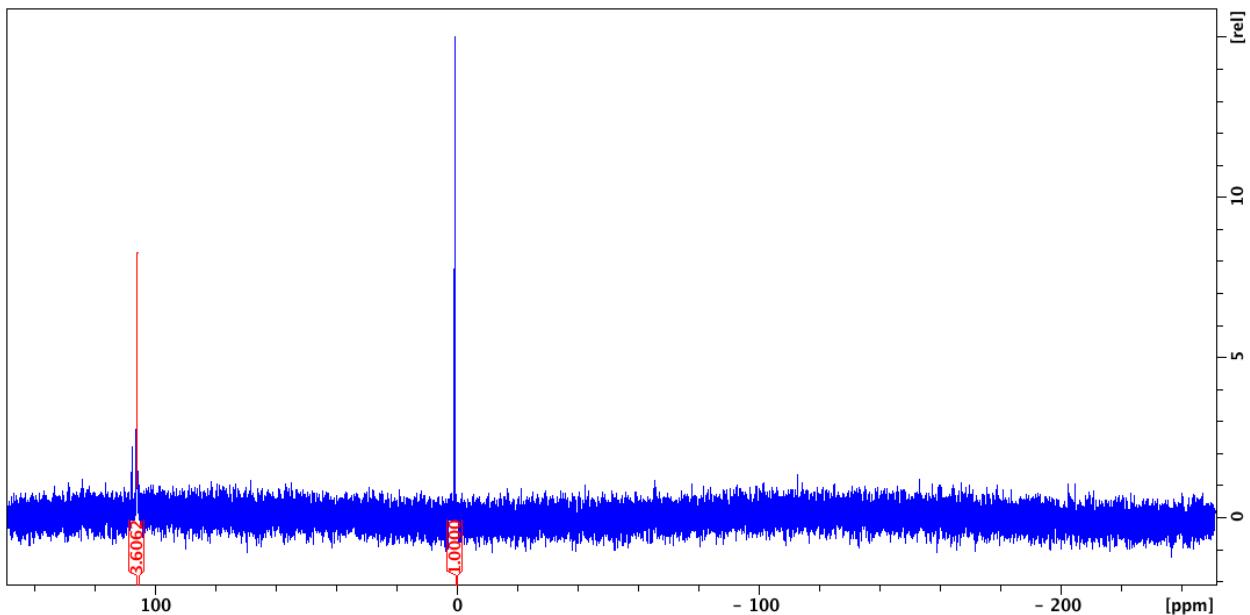


Рисунок А4 – Одномерный ^{31}P ЯМР спектр модифицированного образца GSH-DTP в растворителе- боратный буфер+D₂O

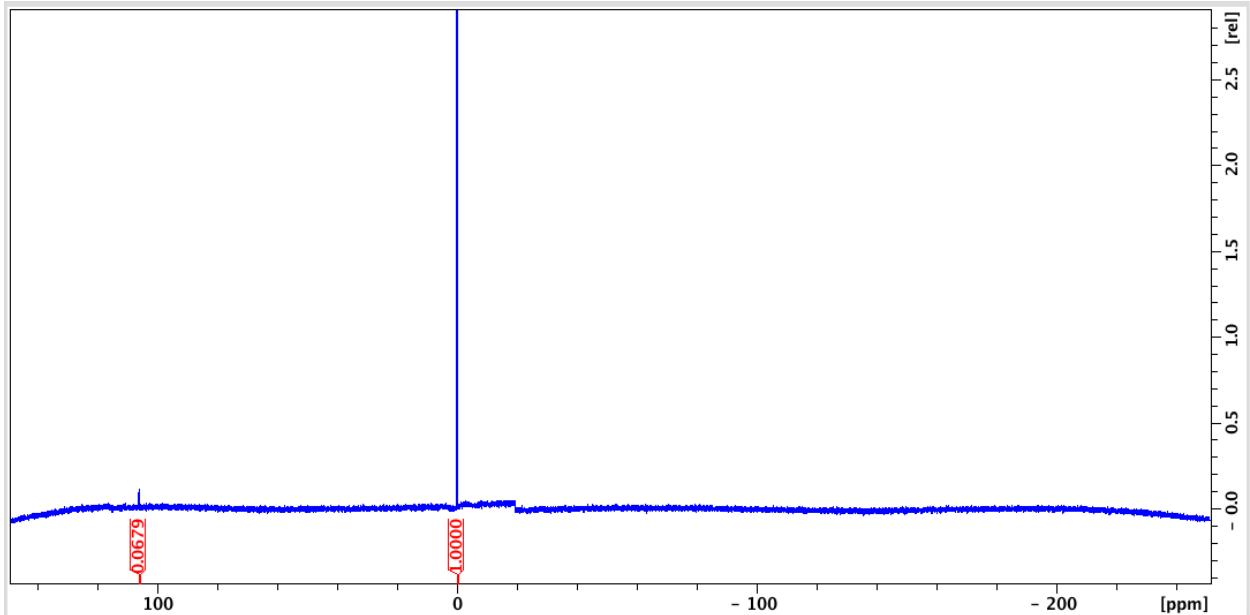


Рисунок А5 – Одномерный ^{31}P ЯМР спектр модифицированного образца GSSG-DTP в растворителе- PBS+D₂O

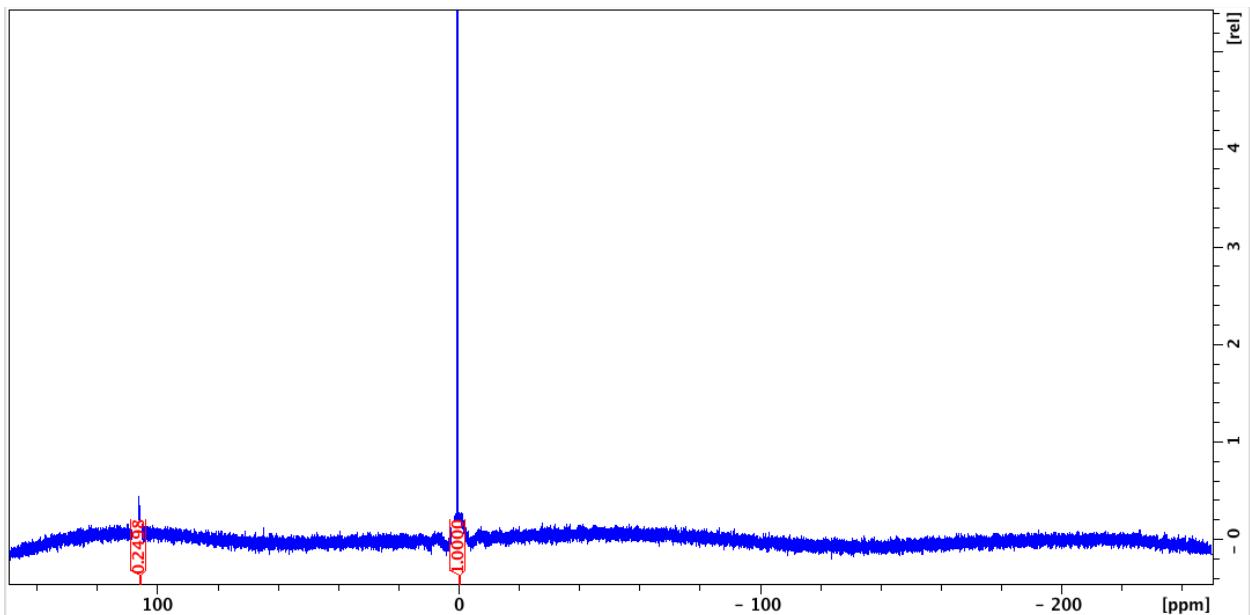


Рисунок А6 – Одномерный ^{31}P ЯМР спектр дитиофосфорной кислоты в растворителе- PBS+D₂O