
**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ, МЕТОДОЛОГИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ**

УДК [577.1: 613.6] :: [615.9: 543.632: 585]

© А. В. Новиков, Г. Н. Кошелева, Р. А. Бубляев, А. В. Манойлов,
Ю. П. Козьмин, Н. В. Краснов, О. А. Миргородская**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
СЕЛЕНА И СЕРЕБРА С ЦИСТЕИНОМ И ГЛУТАТИОНОМ
С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРНОГО КОМПЛЕКСА МХ-5310**

С помощью разработанного в Институте аналитического приборостроения РАН приборного комплекса, включающего времяпролетный масс-спектрометр с электрораспылением МХ-5310 и жидкостной хроматограф Милихром А-02, было проведено исследование взаимодействия селена (Se) с элементами биологических систем на примере цистеина (Cys) и глутатиона (GSH). Выявлено образование двух типов продуктов — дисульфидов и Se-дисульфидов и определены условия, позволяющие изменять соотношения концентраций между этими типами продуктов при взаимодействии Se с GSH. Проведено сравнение процессов взаимодействия Se с GSH, Cys, и смеси GSH с Cys, которое выявило конкуренцию за Se у таких сульфгидрильных соединений. Определено также, что в конкурентных условиях не происходит образования Se-дисульфида Cys, но в значительной степени образуется смешанный дисульфид без Se и с Se. Показано, что образование смешанного Se-дисульфида может протекать через замещение GSH на Cys в симметричном Se-дисульфиде GSH. Можно полагать, что именно селективность замещения лежит в основе регуляции физиологических процессов с участием Se и различных тиолов в биологических средах.

ВВЕДЕНИЕ

Антиоксидантная роль селена (Se) впервые была выявлена английским биохимиком А. Дипломом в 1970 г. [1]. В основе этого процесса лежит взаимодействие Se с глутатионом (GSH) [2].

GSH присутствует в клетке в восстановленном состоянии (SH) в концентрации около 5 мМ. Фактически такая высокая концентрация GSH в клетке приводит к тому, что он может восстанавливать любую дисульфидную связь (S–S), образующуюся между цистеинами цитозольных белков. При этом восстановленная форма GSH превращается в окисленную форму GSH — дисульфид глутатиона (GSSG). GSSG может быть восстановлен под действием фермента глутатионредуктазы, который постоянно находится в клетке в активном состоянии и индуцируется при оксидативном стрессе [1]. Важную роль в этих процессах выполняет Se, участвуя главным образом в функционировании Se-зависимых глутатионпероксидаз. Было показано, что процесс окисления GSH в безферментативной среде ускоряется в присутствии Se (обычно в виде SeO₂). При этом зарегистрировано образование двух типов продуктов — окисленной формы GSH (GS-SG) и Se-дисульфида глутатиона (GS-Se-SG) [2]. Представляло интерес в рамках настоящей работы изучить особенности этого неферментативного взаимодействия Se с GSH, а также влияние на этот процесс другого сульфгидрильного соединения — цистеина (Cys), при-

сутствующего в сопоставимых с GSH количествах во многих биологических средах [1–2].

В связи с тем что постулируется участие GSH в дезинтоксикации тяжелых металлов [3], представлялось целесообразным проверить возможное конкурентное участие в этом процессе Se на примере изучения воздействия на этот процесс ионов серебра, относящегося также к классу тяжелых металлов.

Для изучения особенностей неферментативного взаимодействия GSH и Cys с Se (в виде SeO₂) и в том числе в присутствии ионов серебра использовались два инструментальных метода: масс-спектрометрия с электрораспылением (ESI-о-TOF-MS) — для качественной и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — для количественной оценок.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ****Независимое взаимодействие
Se^{IV} с GSH и Se^{IV} с Cys**

Для исследования взаимодействия Se^{IV} с GSH и Se^{IV} с Cys использовались смеси этих соединений в различных концентрациях. На рис. 1 представлены масс-спектры реакционных смесей, полученные при взаимодействии Se^{IV} с GSH (а) и Se^{IV} с Cys (б) в молярном соотношении 1:1 в водной среде.

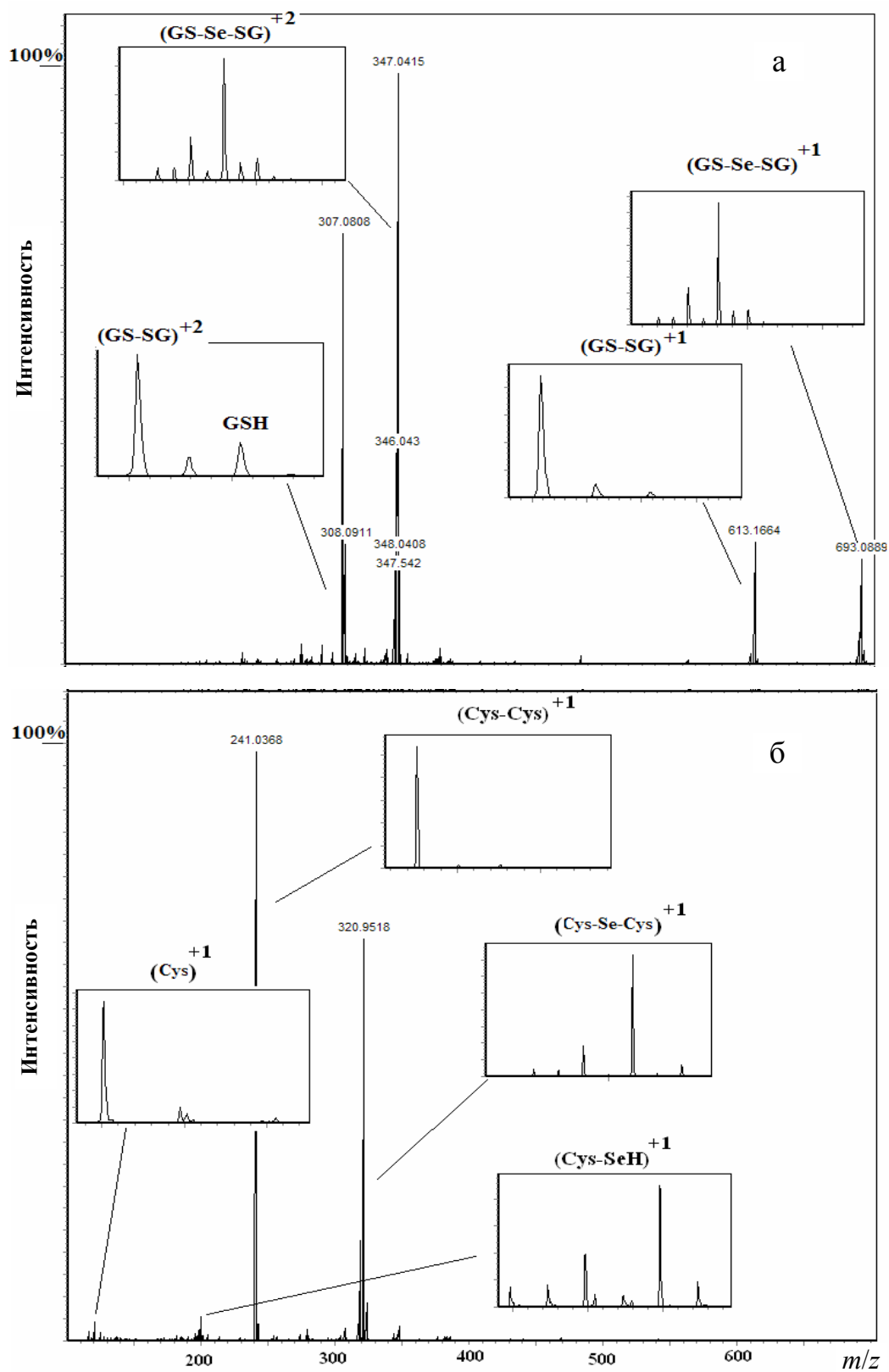


Рис. 1. ESI-масс-спектры реакционных смесей, полученных при взаимодействии Se^{IV} с GSH (а) и Se^{IV} с Cys (б)

Из рис. 1 следует, что в реакционных смесях образовались продукты окисления, а именно дисульфид глутатиона (GS-SG), представленный в масс-спектре двухзарядным ионом с $m/z = 307.08$ и однозарядным ионом с $m/z = 613.16$ (рис. 1, а), и дисульфид Cys (Cys-Cys) в виде только однозарядного иона с $m/z = 241.04$ (рис. 1, б).

Кроме того, наблюдается образование Se-содержащих продуктов для GSH (GS-Se-SG), представленных в масс-спектре двухзарядным ионом с $m/z = 307.3$ и однозарядным ионом с $m/z = 693.16$ (рис. 1, а), а для Cys-содержащих продуктов — Se-дисульфида (Cys-Se-Cys) (рис. 1, б). Все Se-содержащие продукты имеют изотопное распределение, характерное для Se.

В настоящей работе проведен количественный анализ образующихся продуктов в смеси Se^{IV} с GSH с помощью ВЭЖХ. Результаты обработки полученных данных при различных количествах Se^{IV} и GSH в водной среде представлены в табл. 1. Там же представлены данные по спонтанному окислению GSH без Se^{IV} . Концентрации всех продуктов выражены в процентах, рассчитанных из площадей соответствующих хроматографических пиков, что отражает распределение в них глутатиона.

Из табл. 1 видно, что уже через 5 мин наблюдается значительная убыль GSH и появление

продуктов окисления, основным из которых при соотношениях с Se и GSH 1:1 и 1:2 является GS-Se-SG. Отметим, что контрольный эксперимент показал, что в тех же условиях, но без Se окисление GSH не наблюдается по крайней мере в течение часа. Отметим, что доминирование образования GS-Se-SG, возникающее на первых 5 минутах, сохраняется в течение длительного времени (~20 ч).

Как показывают результаты представленные в табл. 2, в присутствии бикарбоната аммония (pH 7.4) ускоряется как реакция GSH с Se, так и скорость спонтанного окисления. В 1 %-й уксусной кислоте скорость взаимодействия с Se замедляется. При этом как в водной среде, так и в присутствии уксусной кислоты, спонтанное окисление GSH в отсутствие Se не наблюдается. Из анализа полученных результатов может быть сделан вывод о том, что увеличение в продуктах реакции доли окисленной формы (GS-SG) при переходе от кислой к щелочной среде связано с изменением концентрации непротонированных сульфгидрильных групп GSH, необходимых для образования этой формы, в то время как образование GS-Se-SG не зависит от pH. В конечном итоге это приводит к перераспределению конечных продуктов реакции и значительному изменению соотношения GS-SG и GS-Se-SG.

Табл. 1. Количественные характеристики реакционных смесей и продуктов реакции

№ п/п	Исходные реагенты		Время реакции, мин	Состав продуктов, содержащих глутатион, %		
	Se^{IV} , мМ	GSH, мМ		GSH	GS-SG	GS-Se-SG
1	0.33	0.33	5	9	27	64
2	0.165	0.33	5	31	21	48
3	0.165	0.33	60	5	25	70
4	0.165	0.33	1140	0	26	74
5	0	0.33	60	100	0	0

Табл. 2. Состав реакционной смеси окиси селена и глутатиона при соотношении 1 : 1 в разных средах

№ п/п	Реакционная среда	Время реакции, мин	Состав продуктов, содержащих глутатион, %		
			GSH	GS-SG	GS-Se-SG
1	Вода	5	9	27	64
2*	— " —	60	100	0	0
3	20 мМ NH ₄ HCO ₃	5	0	69	31
4*	20 мМ NH ₄ HCO ₃	5	96	4	0
5	1 % CH ₃ COOH	14	16	20	64
6	1 % CH ₃ COOH	90	0	21	79
7*	1 % CH ₃ COOH	60	100	0	0

Примечание. * — контроль без селена.

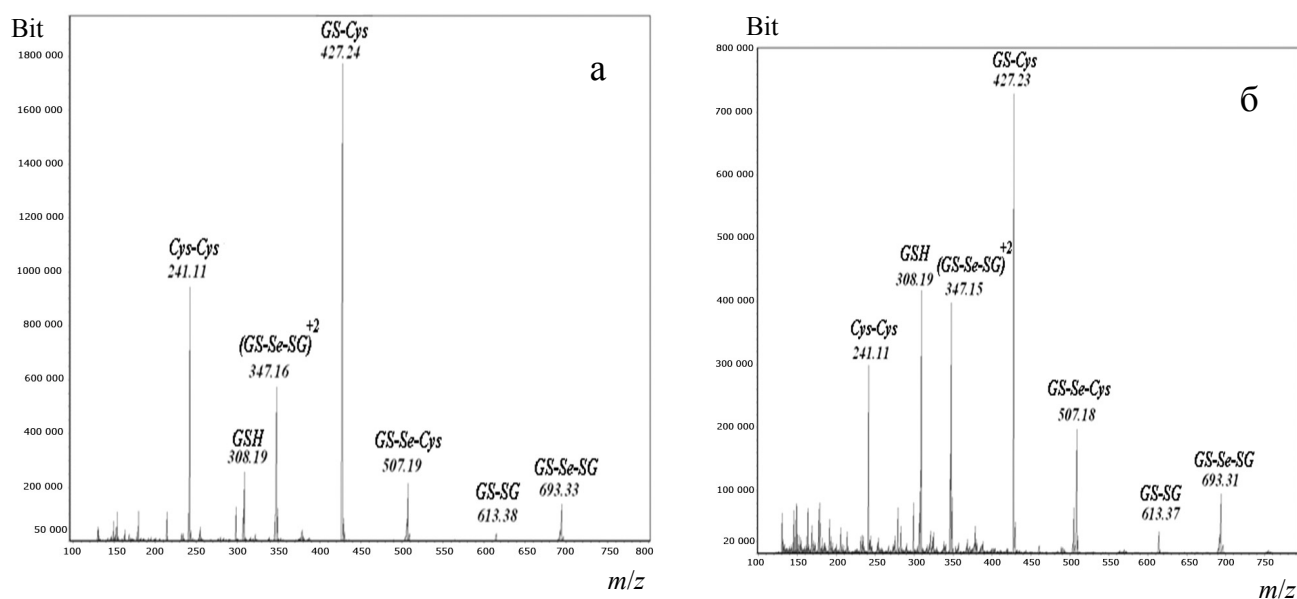


Рис. 3. ESI-масс-спектры реакционных смесей, полученных при взаимодействии Se^{IV} с GSH и Cys при эквимолярном соотношении концентраций Se^{IV} и сульфгидрильных соединений 1:1:1 (а) и при концентрации Se, в 2 раза уменьшенной — 1: 2 : 2 (б)

Конкурентное взаимодействие сульфгидрильных групп цистеина и глутатиона с селеном

Свободный цистеин, являющийся предшественником глутатиона, присутствует в биологических жидкостях одновременно с глутатионом. Оба

соединения являются компонентами антиоксидантной защиты организма человека. Наличие в каждом из них свободной сульфгидрильной группы позволяет обоим соединениям конкурировать друг с другом при взаимодействии с селеном.

В настоящей работе были проведены масс-спектрометрические и хроматографические исследова-

дования взаимодействия Se^{IV} с GSH и Cys при различных концентрациях Se^{IV} и сульфгидрильных соединений.

На рис. 3 представлены результаты масс-спектрометрической детекции смесей Cys и GSH с Se в различных концентрациях. Из рис. 3 видно, что в обоих случаях наиболее интенсивным из дисульфидов является ион с m/z 427.24, соответствующий смешанному дисульфиду SG-Cys. Кроме того, на масс-спектрах присутствуют ионы, соответствующие Cys-Cys и GS-SG. В обоих спектрах также регистрируется Se-дисульфиды GS-Se-SG и GS-Se-Cys в виде одно- и двухзарядных ионов

и "следы" иона Se-дисульфид-цистеина (Cys-Se-Cys) даже в смеси с наибольшей концентрацией Se.

При хроматографии смесей Se^{IV} с GSH и Cys (рис. 4) регистрируются только продукты, содержащие глутатион, поскольку как сам цистеин, так и его окисленная форма спектрофотометрически не детектируются. Наличие продуктов в хроматографических пиках, указанных на этих рисунках, подтверждено масс-спектрометрически. Отметим, что в пиках, подходящих для количественного анализа, не зарегистрирован продукт SG-Cys, однако его концентрация может быть рассчитана из баланса по GSH.

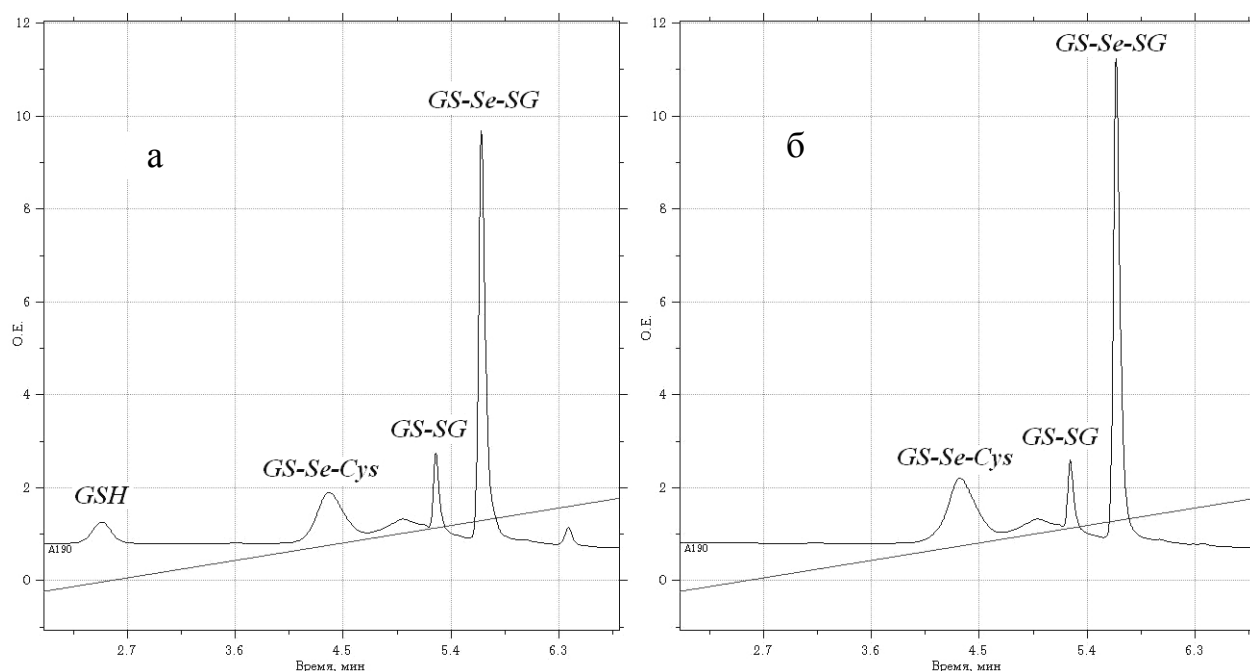


Рис. 4. Хроматограммы реакционных смесей, полученных при взаимодействии Se^{IV} с GSH и Cys при эквимолярном соотношении концентраций Se^{IV} и сульфгидрильных соединений 1:1:1 (а) и при концентрации Se, в 2 раза уменьшенной — 1: 2 : 2 (б)

Табл. 3. Распределение продуктов реакции Cys, GSH и Se в водных смесях при различных соотношениях реагентов

№ п/п	Исходные реагенты, мМ			Состав продуктов, содержащих глутатион, %			
	Se	GSH	Cys	GSSG	GS-Cys	GSSeSG	GS-Se-Cys
1	3.33	3.33	3.33	2.0	14.3	37.9	45.8
2	1.66	3.33	3.33	2.5	31.4	31.8	34.3
3	0.83	3.33	3.33	32.0	28.5	16.4	23.1
4	0.33	3.33	3.33	5.1	68.6	16.6	9.8

С учетом вышеупомянутого из хроматографических данных было рассчитано содержание продуктов, содержащих GSH (табл. 3). Из представленных в таблице данных следует:

- содержание Se-дисульфидов с GSH (GS-Se-SG и GS-Se-Cys) сопоставимо между собой, но выше, чем соответствующих дисульфидов (GS-SG и GS-Cys);
- концентрация GS-Cys существенно превышает концентрацию GS-SG;
- соотношение концентраций обоих типов дисульфидов и Se-дисульфидов выравнивается при уменьшении концентрации в среде.

Для интерпретации полученного набора несимметричных продуктов, образующихся при одновременном взаимодействии с Se, были проведены специальные эксперименты для оценки возможности последующих превращений симметричных продуктов реакции с участием исходных сульфгидрильных соединений. Для этого первоначально была осуществлена реакция GSH с Se^{IV} до полного превращения GSH в смесь окисленного глутатиона и его Se-дисульфида (рис. 5, а). Далее к реакционной среде, содержащей только продукты GS-SG и GS-Se-SG добавлялись в эквимольных количествах либо GSH, либо Cys, либо их

смесь в равных соотношениях. Хроматографический анализ полученных реакционных смесей после 2.5 ч инкубации представлен на рис. 5 (концентрации исходных реагентов и концентрации сульфгидрильных соединений приведены в разделе "Материалы и методы").

Анализируя полученные результаты, представленные на рис. 5, можно отметить, что введение дополнительной порции GSH привело к дополнительному образованию GS-SG и GS-Se-SG (б), что указывает на достаточное количество SeO_2 в реакционной среде. Аналогичным образом продолжается реакция и при дополнительном введении смеси GSH и Cys (в). Однако при внесении одного Cys в реакционную среду в отсутствие GSH наблюдается исчезновение GS-Se-SG (10.1 мМ), и при этом образуется эквивалентное количество смешанного Se-дисульфида — GS-Se-Cys (9.5 мМ).

Таким образом, представленные выше эксперименты подтверждают наличие обменных процессов с участием Se-дисульфидов при наличии соединений со свободными сульфгидрильными группами со скоростями, сопоставимыми с образованием основных продуктов. При этом в процессе замещения

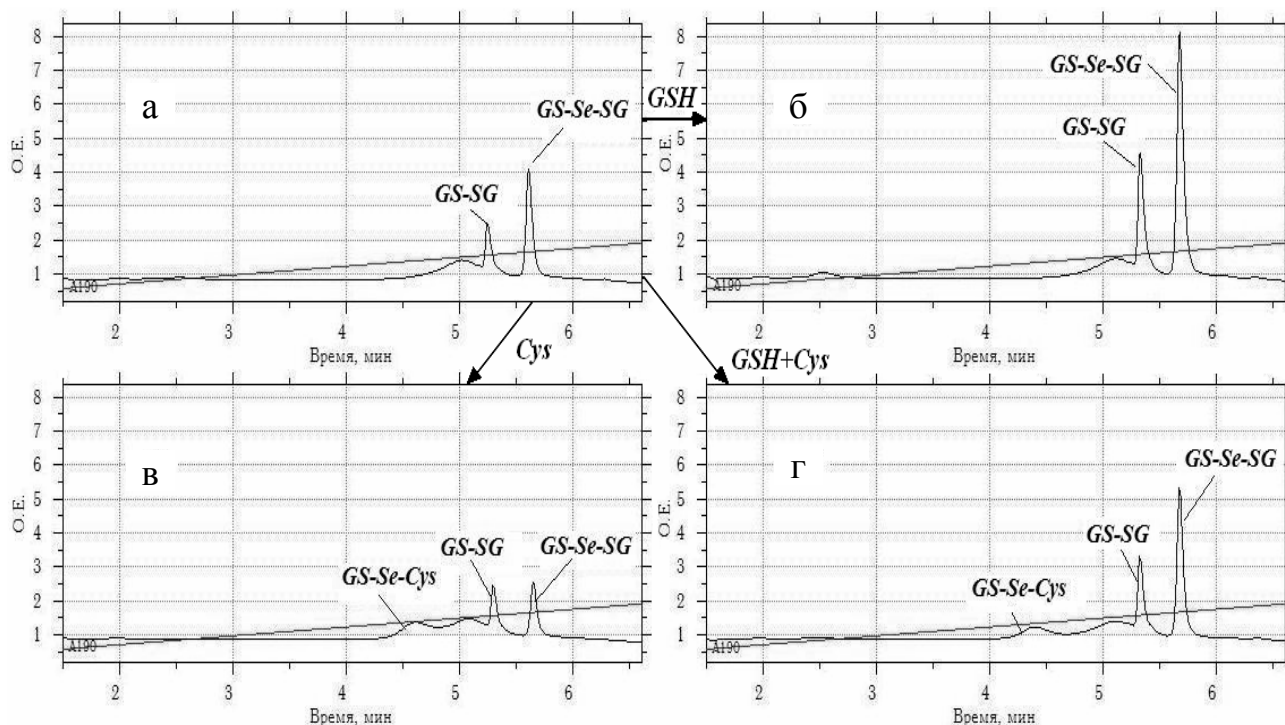


Рис. 5. Хроматограммы реакционных смесей до (а) и после дополнительного введения в реакционную среду GSH (б), Cys (в) и их смеси (г)

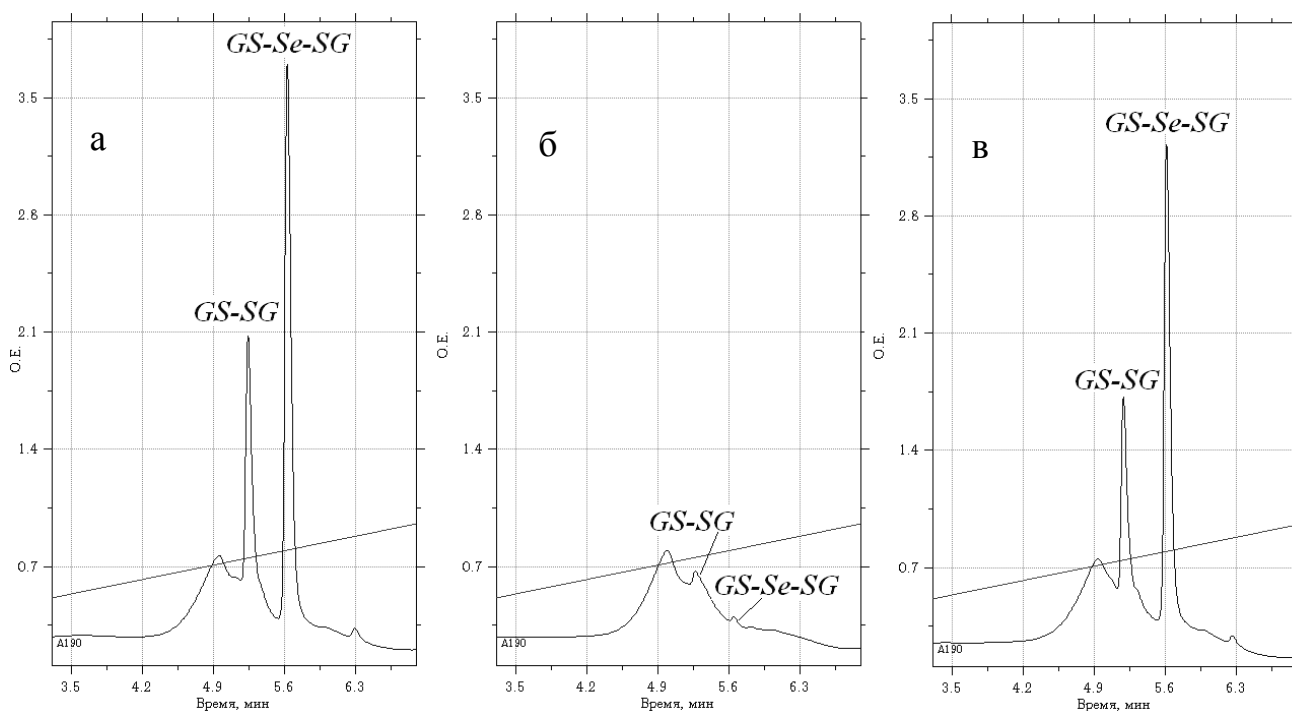


Рис. 6. Хроматограммы реакционных смесей при одновременном добавлении AgNO_3 и Se к GSH (а) и при добавлении AgNO_3 после взаимодействия GSH с Se

в симметричном Se-дисульфиде GS на Cys свободный GSH не регистрируется, поскольку он вступал бы в реакцию с SeO_2 с образованием тех же самых продуктов, которые имелись в реакционной среде до внесения Cys. В конечном итоге система через 2.5 ч приходит к некоторому равновесию, которое представлено набором продуктов, обозначенных на рис. 5, г.

Конкурентное взаимодействие сульфгидрильных групп глутатиона с селеном и ионами серебра

Как уже отмечалось выше, ряд биологически активных соединений и в том числе глутатион принимают активное участие в дезинтоксикации, вызванной присутствием ионов тяжелых металлов. Такое действие может быть обусловлено взаимодействием с металлами сульфгидрильных групп GSH. Можно предположить, что и другие компоненты биологических сред, в том числе и селен, могут корректировать этот процесс. В связи с этим нами были проведены эксперименты по выяснению влияния ионов металлов на взаимодействие глутатиона с селеном на примере ионов серебра.

Эксперименты проводились следующим образом: в раствор со смесью селена и азотнокислого серебра добавлялся GSH. Далее реакционная смесь анализировалась с помощью ВЭЖХ по методике, описанной в предыдущем разделе. На рис. 6 представлены результаты хроматографии

исследованных смесей; анализа хроматограмм — в табл. 4.

В экспериментах контролировалось образование двух продуктов: GS-SG и GS-Se-SG. Отметим, что ни хроматографически, ни масс-спектрометрически продукты GSH с ионами серебра не регистрируются, поскольку образование данного продукта приводит к потере растворимости GS-Ag.

Вместе с тем, как следует из результатов, представленных в табл. 4, при одновременном введении ионов серебра с продуктами реакции пропорционально уменьшается количество двух продуктов GS-SG и GS-Se-SG.

Введение ионов серебра после взаимодействия GSH с селеном не изменяет концентрации продуктов GS-SG и GS-Se-SG. Также было обнаружено, что ионы серебра не взаимодействуют с Se-дисульфидами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проделанные эксперименты свидетельствуют о том, что даже неферментативные реакции селена с глутатионом и цистеином представляют собой совокупность сложных процессов, приводящих к образованию набора продуктов, которые продолжают претерпевать изменения при изменении состава реакционной среды. Этим и обуславливается регуляция различных процессов, протекающих с участием GSH и Se

Табл. 4. Состав реакционных смесей после дополнительного введения азотнокислого серебра в концентрациях от 0 до 33 мМ в реакционную среду, состоящую из 33 мМ глутатиона и 33 мМ селена

№ п/п	AgNO ₃ , мМ	GS-SG и GS-Se-SG		GS-Ag, мМ
		мМ	%	
1	0	0.333	100	0
2	0.0165	0.32	96	0.013
3	0.0494	0.28	84	0.053
4	0.0825	0.25	76	0.083
5	0.165	0.08	23	0.253
6	0.333	0	0	0.333
7	0.333*	0.333	100	0

Примечание. * — в течение 30 мин проведена прединкубация GSH с Se перед добавлением азотнокислого серебра.

в биологических средах, в которых активно участвует и ряд ферментов [4–6]. Отметим, что реальные биологические среды являются более многокомпонентными по набору соединений с сульфгидрильными группами. Они представлены как в белках и пептидах, так и в виде низкомолекулярных соединений, таких как гомоцистин, концентрация которого при ряде патологий существенно превосходит концентрацию GSH [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы вещества: глутатион восстановленный; глутатион окисленный; L-цистеин 99 % (Sigma); диоксид селена (ООО Вектон); муравьиная кислота (Мегск); ацетонитрил (НПК Криохром).

Экспериментальные работы по разработке методики исследования влияния ионов тяжелых металлов и селена на биологические объекты проводились на приборе МХ-5310, оборудованном электрораспылительным источником ионов (electrospray ionization, ESI) и времяпролетным масс-анализатором (TOF) с ортогональным вводом ионов, разработанным в Лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии ИАиП РАН. Все спектры получены в режиме детектирования положительных ионов.

Хроматографию проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А02 (Эконова, Новосибирск). Хроматографическая колонка размером 2 × 75 мм заполнена сорбентом Prontosil 120-5C18AQ (Bischoff, Германия). Элюцию осуществляли градиентом концентрации аце-

тонитрила от 2 до 90 % (по объему) в растворе 0.25 % муравьиной кислоты со скоростью 100–150 мкл/мин. При проведении анализа объем анализируемой пробы составлял 10 мкл, скорость подачи раствора образца — 2 мкл/мин. Площади пиков вычисляли, учитывая, что коэффициент молярной экстинкции глутатиона равен $1.5 \cdot 10^7$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shchrauser H.W.* Selenium // Elements and their Compounds in the Environment. V. 3: Nonmetals / Ed. Merian et al. Wiley-VCH Verlag, 2003. P. 100–106.
2. *Новиков А.В., Бубляев Р.А., Краснов Н.В., Козьмин Ю.П., Кураева Т.Е., Миргородская О.А.* Изучение конкурентного взаимодействия ионов серебра с цистеинсодержащими пептидами и серосодержащими аминокислотами с помощью ESI-MS // Научное приборостроение. 2007. Т. 17, № 4. С. 29–36.
3. *Вапиров В.В., Шубина М.Э., Вапирова Н.В., Беличенко В.И., Шубин И.В.* Селен. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии (обзор). Петрозаводск: ПетрГУ, 2000. 68 с.
4. *Braga P., Montes-Bayon M., Alvarez J., et al.* Characterization, Biological Interactions and in vivo Detection of Selenotrisulfide Derivatives of Glutathion, Cysteine and Homocysteine by HPLC-ICP-MS // J. Anal. At. Spectrom. 2004. V. 19. P. 1128–1133.
5. *Armstrong R.N.* Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases //

- Chem. Res. Toxicol. 1997. V. 10, N 1. P. 2–18.
6. *Kolesnichenko L.S. et al.* Glutathione System in Erythrocytes and Blood Plasma in Strokes and Dyscirculatory Encephalopathy // *Biochemistry. Supplemental Series B: Biomedical Chemistry.* Moscow, 2008. V. 2, N 2. P. 194–197.
7. *Sikora J., Magnucki J., Zietek J., et al.* Homocysteine Serum Concentration and Uterine Artery Color Doppler Examination in Cases of Recurrent Miscarriages with Unexplained Etiology // *Neuroendocrinology letters.* 2007. V. 28, N 4. P. 502–506.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Новиков А.В., Кошелева Г.Н., Бубляев Р.А., Манойлов А.В., Краснов Н.В., Миргородская О.А.)

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва (Козьмин Ю.П.)

Материал поступил в редакцию 14.10.2008.

STUDY OF NONENZYMATIC SELENIUM AND SILVER INTERACTION WITH CYSTEINE AND GLUTATHIONE USING MX-5310 COMPLEX

**A. V. Novikov¹, G. N. Kosheleva¹, R. A. Bublyayev¹, A. V. Manoilov¹,
Yu. P. Kozmin², N. V. Krasnov¹, O. A. Mirgorodskaya¹**

¹*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

²*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

A study of the interaction of selenium (Se) with elements of biological systems cysteine (Cys) and glutathione (GSH) as an example was performed. The study was carried out using complex which includes the liquid chromatograph Milichrom A02 and time-of-flight mass spectrometer with electrospray ionization MX-5310, developed in the Institute for Analytical Instrumentations RAS. Result of this study was a new scheme of chemical reactions. Besides a possibility of the analytical complex to perform a research of a competitive interaction of selenium and silver with sulfhydryl groups GSH was demonstrated.