

## Моделирование редокс-процессов при адсорбции тиолсодержащих аминокислот и кислорода на поверхности золотого катода

И.Е. Миронюк, О.С. Кругляк, Н.В. Нестюк, Г.С. Шаповал

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,  
Украина, 02660 Киев, ул. Мурманская, 1; тел.: (044) 559-70-63;  
e-mail: i\_myronyuk@ukr.net

Редокс-процессы, сопровождающие адсорбцию цистеина и ацетилцистеина на поверхности золотого катода в присутствии кислорода, исследованы методами спектроскопии электрохимического импеданса и дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Установлено, что наряду с восстановлением тиолсодержащих аминокислот происходит их окисление продуктами восстановления кислорода. В результате взаимодействия с активными продуктами восстановления кислорода энергия адсорбции и число латеральных связей цистеина снижаются за счет изменения механизма его адсорбции, в то время как энергия латеральных связей ацетилцистеина возрастает.

Биоорганические реакции, протекающие на поверхности клеточных мембран в биосистемах, представляют собой сложный многостадийный процесс, включающий транспорт к поверхности, определенную ориентацию на ней молекул субстрата, участие медиаторов, собственно реакцию и отвод ее продукта. При этом одной из стадий может быть адсорбция реагирующих молекул, а также перенос электронов, восстановление либо окисление молекул субстрата. В описанном процессе существенную роль играет кислород и его активные формы [1, 2]. Однако исследование таких процессов *in vivo* связано с достаточно большими экспериментальными трудностями, в то время как их моделирование *in vitro* позволяет расширить и углубить существующие представления о механизме элементарных стадий, связанных с переносом электронов и химическими превращениями, сопровождающими этот процесс. Удобной методической базой для такого моделирования является использование электрохимического восстановления кислорода, сопровождающегося образованием его активных продуктов: пероксида водорода, гидроксильных радикалов, супероксид-ионов [1, 2, 4]. На электродах из определенных металлов, в частности из меди и золота, установлена возможность фиксации отдельных стадий этого процесса [4–6]. Благодаря своей инертности золото обладает рядом преимуществ: широкой областью доступных для исследования потенциалов, легко очищаемой и воспроизводимой поверхностью, стабильной в процессе эксперимента.

Изучение редокс-процессов тиолсодержащих аминокислот на поверхности отрицательно заряженного металла при непосредственном участии активных форм кислорода (АФК) открывает возможность более глубокого понимания не только механизма электрохи-

мических реакций на отрицательно заряженной поверхности биомембран, но и процессов образования самоорганизующихся нанослоев [1, 2, 7, 8].

С учетом изложенного, целью настоящей работы было исследование влияния растворенного кислорода на окислительно-восстановительные реакции цистеина и ацетилцистеина при их адсорбции на золотом катоде.

### Материалы и методы исследования

Объекты исследования – L-цистеин (FLUKA) и N-ацетил-L-цистеин (MERCK) – использовали без дополнительной очистки. Растворы аминокислот в 0,1 М водном растворе NaCl готовили непосредственно перед измерениями.

Фоновый электролит (0,1 М раствор NaCl) готовили из дважды перекристаллизованного NaCl квалификации х.ч. в бидистиллированной воде.

Дифференциальные вольтамперные кривые получали в трехэлектродной ячейке с помощью сопряженного с компьютером полярографа ПУ-1 в специальном импульсном режиме [4]. Циклические вольтамперограммы записывали с помощью потенциостата ПИ-50. Потенциал золотого рабочего электрода задавали относительно хлорсеребряного электрода сравнения, вспомогательным электродом служила платиновая спираль.

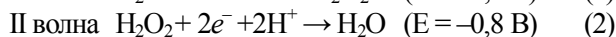
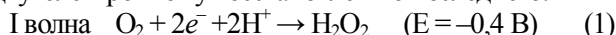
Адсорбцию исследуемых соединений на золотом катоде изучали с помощью универсальной системы ACM Instruments Auto по трехэлектродной схеме [9]. В качестве рабочего использовали торцевой электрод ( $d = 2,0$  мм), вспомогательным служила платиновая пластина ( $25,0 \times 15,0$  мм), потенциал задавали относительно насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения.

Измерения проводили в присутствии и в отсутствие кислорода, для удаления которого раствор продували

предварительно осушенным аргоном высшей очистки в течение 60 мин.

### Результаты исследования и их обсуждение

Рассмотрим вольтамперные кривые восстановления кислорода на золотом электроде на фоне 0,1 М NaCl в воде в области отрицательных потенциалов. На кривой  $I$  (рис. 1) четко видны два пика, первый из которых соответствует двухэлектронному восстановлению молекулярного кислорода до пероксида водорода, второй – двухэлектронному восстановлению последнего:



Кроме того, нельзя исключить возможность ступенчатого одноэлектронного восстановления части молекул пероксида водорода с образованием гидроксильных радикалов, как это происходит при импульсном режиме восстановления кислорода на медном катоде [4]:



Еще один продукт одноэлектронного восстановления  $\text{O}_2$  – супероксид анион  $\text{O}_2^{\cdot -}$  обычно фиксируется в апротонных средах [10]:



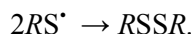
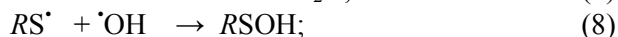
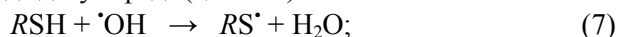
Однако и он может сыграть свою роль в водной среде, когда в двухэлектронном процессе (1) перенос первого электрона сопровождается быстрым химическим взаимодействием с адсорбированной на электроде органической молекулой [2, 11].

Добавление цистеина в раствор фона с кислородом (рис. 1, кривая 1) приводит к снижению высоты пиков обеих волн кислорода (кривые 2, 3). Это дает основание предположить участие цистеина в электрохимиче-

ском восстановлении кислорода, как на первой, так и на второй стадии процесса. При этом, очевидно, происходит окисление цистеина АФК с образованием сульфеновой и сульфиновой кислот:



В случае радикальных АФК образуется тиолят-радикал  $\text{RS}^\cdot$  с последующей возможной рекомбинацией до дисульфида (цистина):



Таким образом, наблюдаемые расширенные пики волн (рис. 1), вероятно, характеризуют процессы восстановления не только кислорода и пероксида водорода, но и образующихся продуктов окисления цистеина. При этом нельзя исключить существенное влияние адсорбции цистеина во всем диапазоне изучаемых потенциалов, что более подробно обсуждено ниже.

Ацетилцистеин также влияет на волны восстановления кислорода (рис. 2): высота пика I волны в присутствии ацетилцистеина уменьшается, а высота пика II волны возрастает.

Следует отметить, что одновременно с восстановлением кислорода с образованием АФК, окисляющих аминокислоты, на электроде возможно электрохимическое восстановление самих тиолсодержащих аминокислот. Исследования электрохимического поведения цистеина в отсутствие кислорода показали, что при потенциале  $E \approx -0,9$  В наблюдается пик волны, который растет с увеличением концентрации цистеина

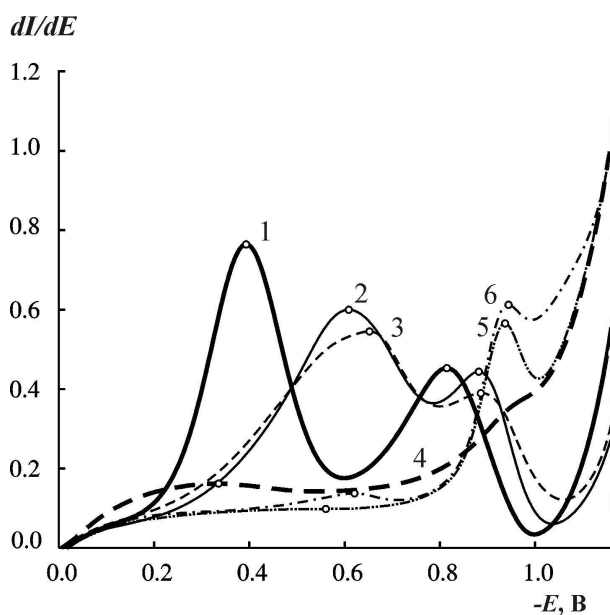


Рис. 1. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на золотом электроде на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) в присутствии цистеина концентраций: 2 – 0,1; 3 –  $0,2 \cdot 10^{-3}$  М/л и дифференциальные вольтамперограммы тех же концентраций цистеина (5, 6) в обескислороженном растворе фона (4)

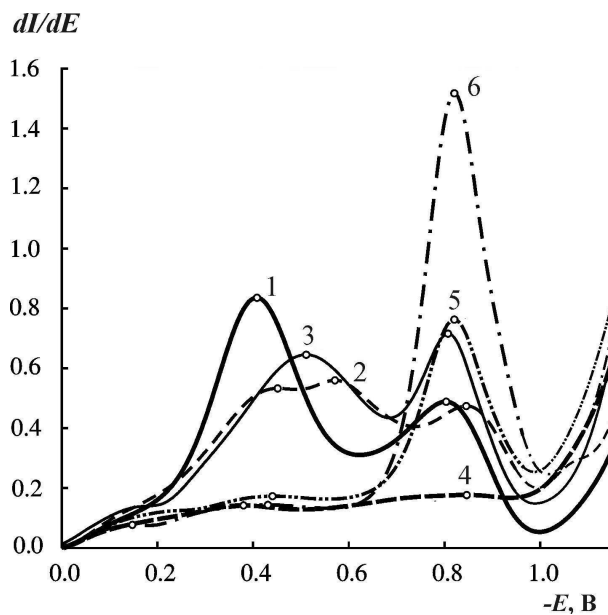
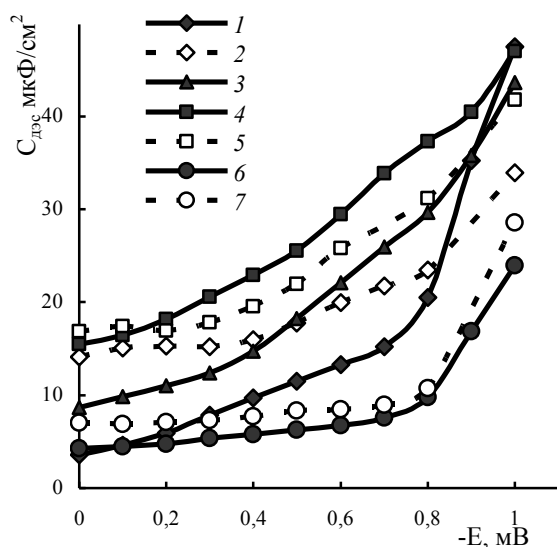
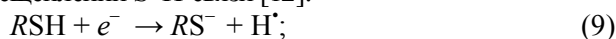


Рис. 2. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на золотом электроде на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) в присутствии ацетилцистеина концентраций: 2 – 0,1; 3 –  $0,2 \cdot 10^{-3}$  М/л и дифференциальные вольтамперограммы тех же концентраций цистеина (5, 6) в обескислороженном растворе фона (4)

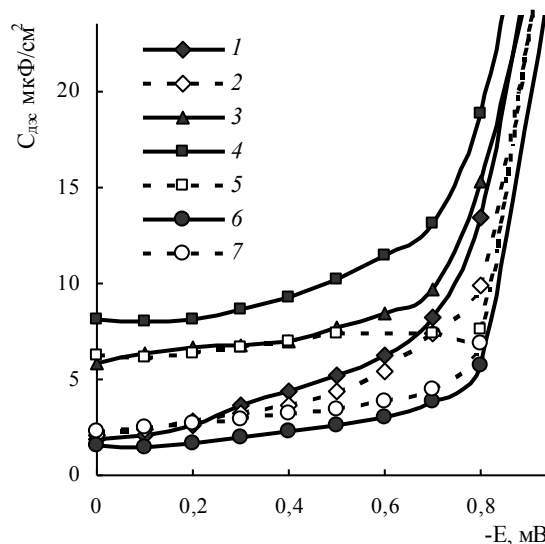


**Рис. 3.** Дифференциальная емкость золотого электрода при различных концентрациях цистеина: 1, 2 – 0,1; 3 – 0,6; 4, 5 –  $1,7 \cdot 10^{-3}$  моль/л; 6, 7 – фон 0,1 М NaCl. 1, 3, 4, 6 – раствор содержит кислород; 2, 5, 7 – кислород удален продувкой аргоном

(рис. 1, кривые 5, 6). Эта волна характеризует восстановление сульфгидрильной группы при катодном расщеплении S–H-связи [12]:

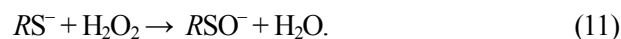


На вольтамперограммах, полученных при аналогичных концентрациях цистеина в растворе, содержащем кислород, четкий отдельный пик при потенциале восстановления сульфгидрильной группы ( $-0,90$  В) не наблюдали, однако виден сдвиг потенциала второго пика восстановления кислорода к  $-0,86$  В и его уширение с ростом концентрации цистеина (рис. 1, кривые 2, 3). Такие изменения морфологии пика могут быть обусловлены не только затруднением восстановления пероксида водорода в присутствии адсорбированного цистеина, но и вкладом восстановления –SH-группы последнего (реакция 9). Одновременное протекание при близких потенциалах процессов (2) и (9) регистрируется на вольтамперограмме как один пик, представляющий собой суперпозицию пиков каждого из процессов. В отсутствие взаимодействия цистеина с продуктами восстановления кислорода суммарный пик этих процессов должен быть суперпозицией кривых 1 и 5 или 1 и 6 соответственно. Судя по морфологии второго пика вольтамперограмм 2 и 3 на рис. 1, нельзя полностью исключить протекание процесса (9) в присутствии кислорода, однако очевидно многократное снижение его интенсивности. Возможно, в присутствии кислорода электрохимическое восстановление цистеина происходит параллельно с взаимодействием с пероксидом водорода и другими интермедиатами восстановления кислорода, образующимися при более низких потенциалах (реакции 5–8). Образовавшиеся при этом тиолят-радикалы  $RS^{\cdot}$  и  $RS^-$  значительно легче



**Рис. 4.** Дифференциальная емкость золотого электрода при различных концентрациях цистеина: 1, 2 – 0,1; 3 – 0,6; 4, 5 –  $1,7 \cdot 10^{-3}$  моль/л; 6, 7 – фон 0,1 М NaCl. 1, 3, 4, 6 – раствор содержит кислород; 2, 5, 7 – кислород удален продувкой аргоном

взаимодействуют с  $H_2O_2$ , чем нейтральный тиол [2, 13]:



Таким образом, пероксид водорода уводится из сферы электрохимической реакции, что проявляется в снижении пика второй волны восстановления кислорода.

При восстановлении ацетилцистеина наблюдается иная картина. На дифференциальной вольтамперной кривой виден четкий, растущий с концентрацией ацетилцистеина пик восстановления при  $E \approx -0,80$  В (рис. 2, кривые 5, 6). Этот пик соответствует восстановлению водорода, образующегося при диссоциации карбоксильной группы, не компенсированной, как в цистеине, аминной, а также сульфгидрильной группы ацетилцистеина. Снижение этого пика в присутствии кислорода вызвано, вероятно, взаимодействием ацетилцистеина с продуктами восстановления кислорода.

Окислительно-восстановительные процессы аминокислот протекают на золотом катоде в двойном электрическом слое (ДЭС), где могут адсорбироваться исследуемые аминокислоты и кислород [5, 7–9].

Рассмотрим данные импедансометрии. Кислород и продукты его восстановления снижают емкость ДЭС во всем диапазоне отрицательных потенциалов, что свидетельствует об их адсорбции на поверхности золотого электрода (рис. 3, кривые 6, 7). Добавление цистеина в фоновый раствор приводит к значительному повышению емкости ДЭС – резкому в бескислородной среде и более плавному в присутствии  $O_2$ .

Аналогичное повышение емкости ДЭС с увеличением концентрации наблюдается и для ацетилцистеина (рис. 4).

Увеличение емкости ДЭС в присутствии цистеина

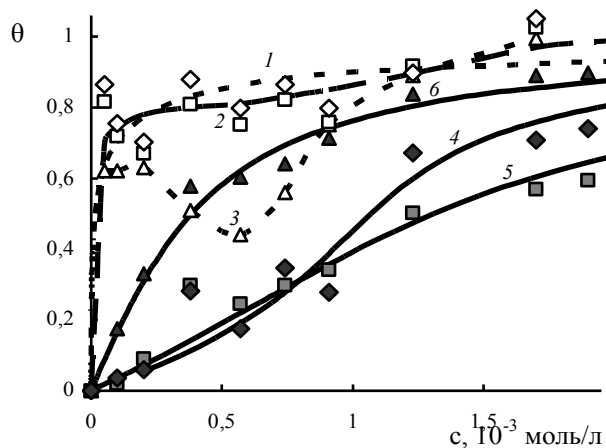


Рис. 5. Изотермы адсорбции цистеина при удалении кислорода из раствора (пунктир) и в присутствии кислорода (сплошные линии) при различных потенциалах: 1, 4 – 0,0 В; 2, 5 – -0,4 В; 3, 6 – -0,8 В

и ацетилцистеина можно объяснить наличием способных к специфической адсорбции сульфгидрильных групп. Такой эффект, очевидно, обусловлен адсорбцией этих аминокислот в виде анионов благодаря возможности депротонирования сульфгидрильных групп (реакция 9). Это приводит к увеличению плотности отрицательного заряда электрода. Аналогичное повышение емкости ДЭС серебряного катода наблюдали в процессе адсорбции цистеина Г. Хагер и А. Броло [14]. На основе полученных данных построены изотермы адсорбции цистеина (рис. 5) и ацетилцистеина (рис. 6) в присутствии и в отсутствие кислорода.

Высокие степени заполнения электрода в отсутствие кислорода в ячейке (рис. 5, пунктир), практически не зависящие от концентрации цистеина и потенциала, подтверждают его способность адсорбироваться на золоте с образованием устойчивых высокоупорядоченных слоев [7, 8, 14]. Наличие в растворе кислорода приводит к существенному снижению максимальных степеней заполнения, (рис. 5, кривые 4, 5). Таким образом, кислород затрудняет формирование адсорбционного слоя цистеина за счет конкурентной адсорбции  $O_2$  и продуктов его восстановления. В то же время при более высоких отрицательных потенциалах, превышающих потенциал восстановления кислорода, наблюдаются более высокие значения  $\theta$ , связанные с адсорбцией продуктов взаимодействия цистеина с АФК (реакции 5–8, 11), что приводит к изменению структуры адсорбционного слоя.

На изотермах адсорбции ацетилцистеина в отсутствие кислорода максимальные степени заполнения электрода достигаются при концентрации  $0,4 \cdot 10^{-3}$  моль/л. С дальнейшим возрастанием концентрации ацетилцистеина при потенциале -0,80 В значения  $\theta$  снижаются (рис. 6). Можно предположить, что различия в поведении цистеина и ацетилцистеина связаны со строением их молекул. Если цистеин существует в

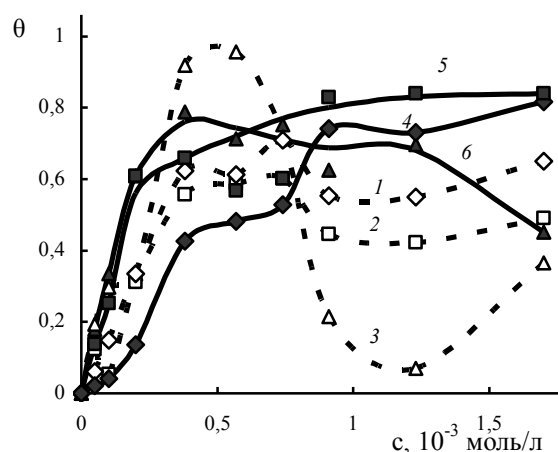


Рис. 6. Изотермы адсорбции ацетилцистеина при удалении кислорода из раствора (пунктир) и в присутствии кислорода (сплошные линии) при различных потенциалах: 1, 4 – 0,0 В; 2, 5 – -0,4 В; 3, 6 – -0,8 В

растворе в виде электронейтральных цвиттер-ионов, то ацетилцистеин – в виде карбоксилат-анионов, нескомпенсированный заряд которых усиливает их электростатическое отталкивание от поверхности катода.

В присутствии кислорода изотерма адсорбции ацетилцистеина для потенциала нулевого заряда изменяется подобно изотерме цистеина. В то же время для негативных потенциалов наблюдается более быстрое достижение высоких степеней заполнения, чем в отсутствие кислорода (рис. 6). Вероятно, это связано с окислением ацетилцистеина АФК (реакции 5–8, 11) и последующей адсорбцией окисленных продуктов.

Расчитанные из полученных данных энергии адсорбции (таблица) показывают, что в отсутствие кислорода цистеин гораздо прочнее связывается с поверхностью электрода, чем ацетилцистеин, несмотря на то, что обе аминокислоты содержат якорную тиольную группу [15]. Это подтверждает предположение о влиянии  $COO^-$  группы ацетилцистеина. Об этом также свидетельствуют рассчитанные нами значения энергии латеральных взаимодействий боковых групп адсорбированных молекул  $-\Delta G_L$  (таблица). Если в случае цистеина полученные значения энергии латеральных взаимодействий характеризуют сильное притяжение соседних молекул, то для ацетилцистеина преобладают силы электростатического отталкивания  $-\Delta G_L < 0$ .

Присутствие кислорода практически нивелирует различия в энергии взаимодействия адсорбированных аминокислот с поверхностью электрода, что, вероятно, связано с существенным влиянием конкурентной адсорбции кислорода. Однако воздействие кислорода на величину  $\Delta G_a$  цистеина и ацетилцистеина значительно отличаются (таблица). Следовательно, влияние кислорода на процесс адсорбции цистеина не ограничивается только конкурентной адсорбцией самого кислорода, но включает и взаимодействие с продуктами его восстановления. Это подтверждается также существен-

Таблица. Свободная энергия адсорбции ( $\Delta G_a$ , кДж/моль) цистеина и ацетилцистеина на золотом электроде при различных потенциалах в присутствии и в отсутствии кислорода

	-E, В	O <sub>2</sub>		Ar	
		$-\Delta G_L$ , кДж/моль	$-\Delta G_a$ , кДж/моль	$-\Delta G_L$ , кДж/моль	$-\Delta G_a$ , кДж/моль
Цистеин	0	6,4	23,2	13,6	43,9
	0,4	3,8	24,0	11,7	42,6
	0,8	1,9	28,0	16,6	42,2
Ацетилцистеин	0	6,1	24,9	-1,41	28,41
	0,4	1,0	29,3	-0,24	28,63
	0,8	4,2	28,8	-7,79	27,74

ным изменением зависимости энергии адсорбции от потенциала.

Величина энергии латеральных взаимодействий  $-\Delta G_L$  для цистеина резко снижается в присутствии кислорода, что свидетельствует о нарушении условий для формирования межмолекулярных водородных связей, характерных для самоорганизующихся слоев. Влияние кислорода на энергию латеральных взаимодействий ацетилцистеина противоположно:  $\Delta G_L$  меняет знак (таблица). Таким образом, в присутствии O<sub>2</sub> между адсорбированными молекулами ацетилцистеина возникают дополнительные связи (водородные или другие), превалирующие над электростатическим отталкиванием  $-\Delta G_L > 0$ , которое преобладает в бескислородной среде. Очевидной причиной этого может быть адсорбция окисленных форм ацетилцистеина, образованных в результате его взаимодействия с АФК.

Таким образом, под влиянием кислорода на золотом катоде происходят достаточно сложные окислительно-восстановительные реакции тиолсодержащих аминокислот цистеина и ацетилцистеина. Последние взаимодействуют с продуктами восстановления O<sub>2</sub>, в результате чего происходит окисление сульфгидрильных групп. Для цистеина это приводит к резкому снижению энергии связи с подложкой за счет изменения механизма его адсорбции, а также к ослаблению латеральных взаимодействий.

Для ацетилцистеина энергия связи с подложкой в присутствии O<sub>2</sub> изменяется незначительно, а количество латеральных связей возрастает, что способствует более эффективной адсорбции. Такие различия во влиянии кислорода и АФК на адсорбцию исследуемых аминокислот могут быть связаны с наличием нескомпенсированной карбоксильной группы в ацетилцистеине. Можно предположить, что аналогично эти аминокислоты могут вести себя на отрицательно заряженной поверхности клеточных мембран в присутствии кислорода и АФК.

Обнаруженная специфика влияния кислорода и продуктов его восстановления на адсорбцию ацетилцистеина и цистеина на золотом катоде может быть полезной при построении моделей, характеризующих

процессы с участием таких аминокислот на поверхности отрицательно заряженных биомембран, а также при создании биосенсоров.

Таким образом, результаты исследования указывают на возможность протекания на поверхности золотого катода параллельных процессов восстановления тиолсодержащих аминокислот и их окисления активными формами кислорода.

Показано существенное влияние кислорода на процесс адсорбции цистеина и ацетилцистеина на золотом катоде. Взаимодействие с активными продуктами восстановления кислорода на поверхности золотого катода приводит к снижению энергий адсорбции и латеральных взаимодействий цистеина за счет изменения механизма его адсорбции, а в случае ацетилцистеина – способствует образованию более эффективных латеральных связей между адсорбированными молекулами.

Моделирование окислительно-восстановительных реакций при адсорбции цистеина и ацетилцистеина на золотом катоде дает возможность расширить представления о процессах с участием тиолсодержащих аминокислот на отрицательно заряженной поверхности биомембран, а также может быть использовано при создании биосенсоров на их основе.

1. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford Univ. Press, New York, 2007.

2. *Molecular Basis of Oxidative Stress. Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis*, ed. F.A. Villanena, Wiley, 2013.

3. Roos G., Messens J., *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, **51** (2), 314–326.

4. Громовая В.Ф., Шаповал Г.С., Миронюк И.Е., *Журн. общ. химии*, 2002, **72** (5), 828–831.

5. Антропов Л.И., *Теоретическая электрохимия*, Москва, Высш. шк., 1984.

6. Андоралов В.М., Тарасевич М.Р., Трипачев О.В., *Электрохимия*, 2011, **47** (12), 1420–1430.

7. Sahli R., Fave C., Raouafi N. et al., *Langmuir*, 2013, **29** (17), 5360–5368.
8. Shaojun D., Jinghong L., *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 1997, **42**, 7–13.
9. Миронюк И.Е., Шаповал Г.С., Громова В.Ф. и др., *Теорет. и эксперим. химия*, 2004, **40** (2), 105–109.
10. Фиошин М.Я., Смирнова М.Г., *Электросинтез окислителей и восстановителей*, Ленинград, Химия, 1981.
11. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Цирлина Г.А., *Электрохимия*, Москва, Химия, КолосС, 2006.
12. Бухтиаров А.В., Михеев В.В., Лебедев А.В. и

- др., *Журн. общ. химии*, 1988, **58** (3), 684–692.
13. van Bergen L.A.H., Roos G., F. De Proft, *J. Phys. Chem. A*, 2014, **118**, 6078–6084.
14. Hager G., Brolo A.G., *J. Electroanal. Chem.*, 2003, **550–551**, 291–301.
15. Maksymovych P., Voznyu O., Dougherty D.B. et al., *Progress Surf. Sci.*, **85** (5–8), 206–240.

Поступила в редакцию 26.05.2015 г.

## Моделювання редокс-процесів при адсорбції тиолвмісних амінокислот і кисню на поверхні золотого катода

*І.Є. Миронюк, О.С. Кругляк, Н.В. Нестюк, Г.С. Шаповал*

*Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України,  
Україна, 02660 Київ, вул. Мурманська, 1; тел: (044) 559-70-63;  
e-mail: i\_myronyuk@ukr.net*

Редокс-процеси, що супроводжують адсорбцію цистеїну та ацетилцистеїну на поверхні золотого катода в присутності кисню, досліджені методами спектроскопії електрохімічного імпедансу та диференціальної імпульсної вольтамперометрії. Встановлено, що водночас із відновленням тиолвмісних амінокислот відбувається їх окиснення продуктами відновлення кисню. У результаті взаємодії з активними продуктами відновлення кисню енергія адсорбції та кількість латеральних зв'язків цистеїну знижується за рахунок зміни механізму його адсорбції, а енергія латеральних зв'язків ацетилцистеїну зростає.

## Modeling of redox-processes during adsorption of thiol-containing amino acids and oxygen on the surface of the gold cathode

*I.Ye. Myronyuk, O.S. Kruglyak, N.V. Nestyuk, G.S. Shapoval*

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NAS of Ukraine,  
1, Murmanska str., 02660 Kyiv, Ukraine, Tel.: 380 (044) 559-70-63;  
E-mail: i\_myronyuk@ukr.net*

Redox-processes that accompany adsorption of cysteine and acetylcysteine on the surface of the gold cathode in the presence of oxygen were investigated by electrochemical impedance spectroscopy and differential pulse voltammetry. It was found that along with electrochemical reduction of the thiol-containing amino acids these amino acids became oxidized by the products of oxygen reduction. It was shown that interaction with active oxygen products resulted in decline of both adsorption energy and number of lateral bonds of cysteine because of the changes in cysteine adsorption mechanism, while the energy of lateral bonds of acetylcysteine increased.