

УДК 577.16 + 541.128

**Пищугин Ф.В.***член-корреспондент НАН КР,  
д.х.н, профессор***Пищугин Ф.В.***х.и.д. , профессор,  
КР УИАнын мүчө-корреспондентти  
**Pishugin F.V.**  
*doctor of chemical sciences, professor****Тулбердиев И.Т.,***к.х.н., в.н.с.***Тулбердиев И.Т.,***х.и.к., б.и.к.***Tuleberdiev I.T.,***cand. chem. sci.,  
leading researcher***Лецкевич А.В.,***научный сотрудник,***Лецкевич А.В.,***илимий кызматкер***Letskevich A.V.,***researcher*

*Институт Химии и фитотехнологии НАН КР  
КР УИАнын Химия жана фитотехнология институту  
Institute of chemistry and fitotechnology NAS KR*

## **ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ КОНДЕНСАЦИИ ПИРИДОКСАЛЯ С L- $\alpha$ -ГИСТИДИНОМ**

### **ПИРИДОКСАЛДЫН L- $\alpha$ -ГИСТИДИН МЕНЕН БОЛГОН КОНДЕНСАЦИЯСЫНЫН ПРОДУКТУЛАРЫНЫН ӨЗ АРА АРАКЕТТЕНИШҮҮСҮ**

### **CHEMICAL TRANSFORMATIONS OF PYRIDOXAL CONDENSATION PRODUCTS WITH L- $\alpha$ - HISTIDINE**

**Аннотация.** Изучена кинетика и механизм взаимодействия пиридоксаля с L- $\alpha$ -гистидином. Реакция L- $\alpha$ -гистидина с пиридоксалем протекает через три кинетически различные стадии: первая быстрая стадия - присоединение аминокислоты к пиридоксалу с образованием аминок спирта и последующей его перестройкой структуры, вторая, более медленная стадия – дегидратация аминок спирта с образованием основания Шиффа и третья очень медленная стадия – отщепление CO<sub>2</sub> от L- $\alpha$ -аминокислотного фрагмента, перестройка основания Шиффа в хиноидную структуру, последующий гидролиз которой приводит

к образованию пиридоксаля гистамина. Предложена схема химических превращений продуктов конденсации пиридоксаля с L- $\alpha$ -гистидином.

**Аннотация.** Пиридоксалдын L- $\alpha$ - гистидин менен аракеттенишүү механизми жана кинетикасы изилденди. L- $\alpha$ - гистидин менен пиридоксалдын конденсациясы ар түрдүү үч кинетикалык стадия аркылуу жүрөт: биринчи тез стадия- амин кислоталарынын пиридоксалга кошулуп амин спиртин пайда кылат. Андан кийин кайра курулуу жүрөт, жай жүргөн стадия-амин спиртинин Шиффтин негиздерин пайда кылуу менен жүргөн дегидратациясы жана өтө жай жүрүүчү стадия - L- $\alpha$ -аминкислоталык фрагменттен CO<sub>2</sub>, Шиффтин негиздеринин хиноиддик структураны кайра пайда кылуусу, андан кийин жүргүзүлгөн гидролиз пиридоксаль менен гистаминди пайда кылуу менен жүрөт. L- $\alpha$ -гистидин пиридоксалдын конденсациясынын продуктуларынын химиялык айлануусунун схемасы келтирилген.

**Abstract.** The kinetics and mechanism of interaction of pyridoxal with L- $\alpha$ -histidine have been studied. L- $\alpha$ -histidine with pyridoxal proceeds through three kinetically different stages: the first fast stage is the addition of an amino acid to pyridoxal with the formation of an amino alcohol and its subsequent restructuring, the second, slower stage is the dehydration of amino alcohol with the formation of a Schiff base, and the third very slow stage is the cleavage of hydrogen CO<sub>2</sub> from the L- $\alpha$ -amino acid fragment, restructuring Schiff bases into a quinoid structure, the subsequent hydrolysis of which leads to the formation of pyridoxal histamine. A scheme of chemical transformations of pyridoxal condensation products with L- $\alpha$ -histidine is proposed.

**Ключевые слова:** Витамины B<sub>6</sub>, аминокислоты, структуры аминокислот и оснований Шиффа.

**Негизги сөздөр:** B<sub>6</sub> витаминдери, аминокислоталар, аминокислоталардын түзүлүшү жана Шифф негиздери.

**Keywords:** Vitamins B<sub>6</sub>, Amino acids, Structure of amino acids and bases Schiff.

Пиридоксаль и пиридоксаль-5'-фосфат являются коферментами огромного количества ферментативных систем, катализирующих биохимические превращения аминокислот и аминов – переаминирование, элиминирование, декарбоксилирование, расщепление боковой цепи аминокислот и т.д. Опубликован ряд работ по изучению механизма действия этих ферментов и их моделей [1]. Однако, ввиду сложности этих систем, быстрого и иногда неоднозначного протекания ферментативных реакций вопросы кинетики и механизма химических превращений аминокислот остаются открытыми. [2]

Гистидин -  $\alpha$ -амио- $\beta$ -[4(5)-имидозалил] пропионовая кислота – входит в состав многих белков в том числе глобина. В гемоглобине за счет пиридинового атома азота ими-

дазольного фрагмента этой кислоты белок глобин связывается с атома железа гема.

Особенности строения имидозольного кольца объясняют важную роль гистидина в некоторых ферментативных реакциях, в частности, его способность осуществлять кислотный (за счет пиррольной NH-группы) и основной (за счет пиридинового атома азота) катализ.

Являясь одновременно и донорами а акцепторами протонов, имидозол и его производные обладают уникальной способностью катализировать реакции нуклеофильного замещения функциональных производных карбоновых кислот. На примере гидролиза сложного эфира, имидозол, образуя водородную связь с молекулой воды повышает его нуклеофильную активность, Кроме

того, переход протона тетраэдрическом интермедиате от имидозолей-катиона к атому кислорода спиртового остатка способствует отщеплению хорошо уходящей группы молекулы спирта.

Это свойство имидозола играет важную роль в механизме действия гидролитических ферментов, содержащих остаток аминокислоты и гистидина в активном центре ферментов, расщепляющих пептидные связи в белках. Имидозольные циклы встречаются в составе некоторых алкалоидов.

В химии  $\alpha$ -аминокислот большое внимание уделяется строению и свойствам радикалов R которые играют важную роль в формировании структуры белков и выполнению ими биологических функций. При этом рассматриваются такие характеристики, как полярность радикалов, наличие в них функциональных групп и способность этих групп к ионизации.

Биогенные амины в организме выполняют важные биологические функции например, получающийся при декарбоксилировании гистидина биогенный амин – гистамин – обладает широким спектром биологического действия и, в частности имеет отношение к аллергическим реакциям организма.

Одна из наиболее ярких характеристик гистидина – возможность трансформироваться в другие вещества, например, в гистамин. Гистидин участвует в ряде метаболических реакций, входит в состав гемоглобина, поэтому способствует снабжению кислородом органов и тканей. Кроме того, помогает выводить из организма тяжелые металлы, восстанавливать ткани и укреплять иммунитет. Другие функции гистидина: регулирование кислотности крови; ускорение заживления ран; координация механизмов роста; естественное восстановление организма.

Без гистидина все процессы, связанные с ростом, остановятся, а регенерация

поврежденных тканей станет невозможной. Последствием отсутствия гистидина в организме являются воспаления кожи и слизистых оболочек тела, а восстановление после хирургических операций затянется на более долгое время. Кроме того, гистидин обладает терапевтическим эффектом при воспалениях, а значит, является действенным лекарством при артритах. Помимо уже названных полезных свойств, эта аминокислота обладает еще одной не менее значимой способностью – помогает формировать миелиновые оболочки нервных клеток (их повреждение вызывает болезни Паркинсона и Альцгеймера, а также другие дегенеративные заболевания). Также эта полузаменимая аминокислота участвует в синтезе красных и белых кровяных клеток (эритроцитов и лейкоцитов), участвует в защите от радиационного излучения.

Гистамин представляет собой органическое азотистое соединение, участвующее в передаче местных иммунных реакций, а также регулирующее физиологические функции в кишечнике и действующее как нейромедиатор для головного, спинного мозга и матки.

С тех пор, как гистамин был открыт в 1910 году, его считали местным гормоном (аутокоидом), поскольку у него отсутствуют классические эндокринные железы, которые его секретировали; однако в последние годы гистамин был признан центральным нейротрансмиттером.

Гистамин участвует в воспалительной реакции и играет центральную роль в качестве медиатора зуда. Как часть иммунного ответа на чужеродные патогены, гистамин вырабатывается базофилами и тучными клетками, обнаруженными в близлежащих соединительных тканях.

Гистамин увеличивает проницаемость капилляров для белых кровяных телец и некоторых белков, позволяя им поражать патогенные микроорганизмы в инфицированных тканях.

Он состоит из имидазольного кольца, присоединенного к этиламиновой цепи; в физиологических условиях аминогруппа боковой цепи протонируется.

Гистамин имеет два основных центра, а именно алифатическую аминогруппу и тот атом азота имидазольного кольца, у которого еще нет протона.

В физиологических условиях алифатическая аминогруппа (имеющая  $pK_a$  около 9,4) будет протонирована, тогда как второй азот имидазольного кольца ( $pK_a \approx 5,8$ ) протонирован не будет.

Таким образом, гистамин обычно протонируется до однозарядного катиона. Поскольку кровь человека слабоосновная (с нормальным диапазоном рН от 7,35 до 7,45), следовательно, преобладающая форма гистамина, присутствующая в крови человека, является монопротективной по алифатическому азоту. Гистамин является нейромедиатором.

### Экспериментальная часть

В ряде работ [3-9] УФ-спектрометрическим и поляриметрическим методами изучены реакции пиридоксаль и пиридоксаль-5'-фосфата с аминокислотами. Показано, что реакции аминокислот включают несколько стадий. Первая очень быстрая стадия – присоединение аминокислот к коферментам с образованием аминоспиртов. Вторая стадия более медленная – дегидратация аминоспиртов с образованием оснований Шиффа. Третья самая медленная стадия – элиминирование структурных фрагментов аминокислот с образованием хиноидных структур, гидролиз которых приводит к конечным продуктам. Скорости каждой из этих стадий зависят от растворителя, рН среды, температуры. Показано, что L-α-аминокислоты под действием пи-

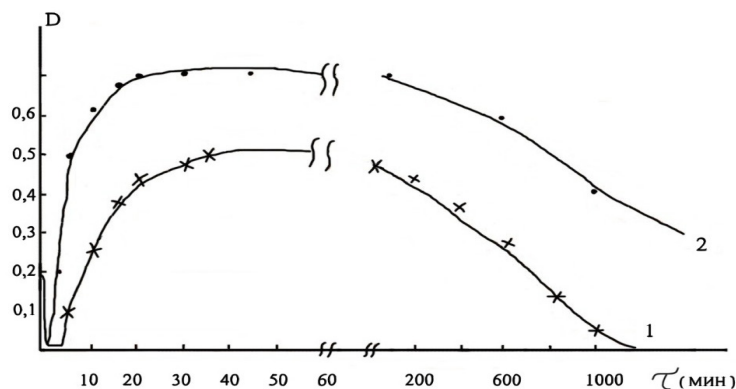
ридоксаль отщепляют α-водород с образованием в качестве конечных продуктов пиридоксамина и новой кето кислоты, а D-α-аминокислоты отщепляют CO<sub>2</sub> с образованием в качестве конечных продуктов - пиридоксаль и амина.

Представляло интерес изучить кинетику конденсации пиридоксаль

с L-α-гистидином методами квантовой химии оценить пространственную структуру, заряды на реакционных центрах, энергию исходных соединений, промежуточных и конечных продуктов, а также попытаться выделить и идентифицировать промежуточные и конечные продукты реакций и установить механизм их превращений.

На рис 1. Показано изменение оптической плотности смесей растворов пиридоксаль гидрохлорида с L-α-гистидином при различных температурах. Было обращено внимание, что при низких температурах вначале оптическая плотность резко падает практически до нуля (стадия присоединения аминокислоты к карбонильной группе пиридоксаль с образованием аминоспирта), потом на кинетической кривой наблюдается индукционный период, по видимому связанный с перестройкой структуры аминоспирта под действием имидазольного фрагмента, гидролиз которого (неожиданно для L-α-аминокислот) приводит к образованию пиридоксаль и гистамина.

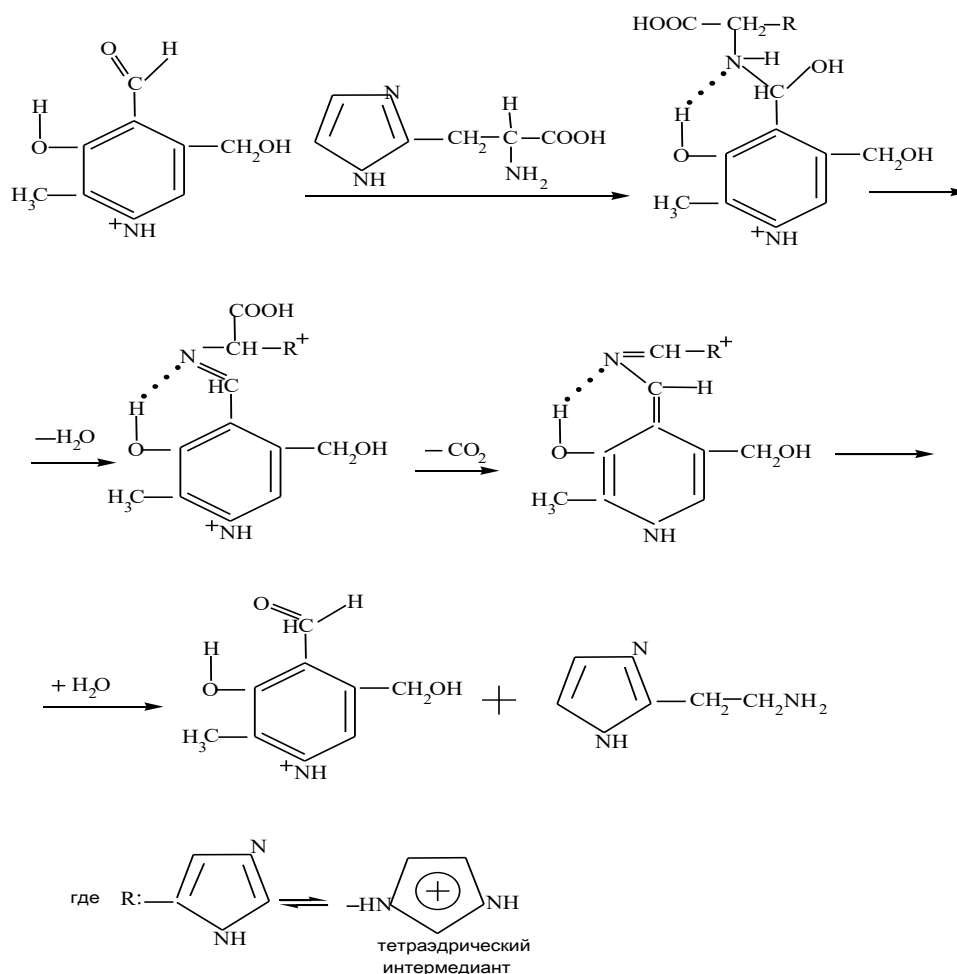
Поскольку карбонильная группа в пиридоксале повернута на 180° относительно плоскости пиридинового фрагмента, присоединение стереоизомерных аминокислот в каждом случае дает аминоспирты с различным расположением пиридинового и аминокислотных фрагментов. Структура аминоспиртов, по-видимому, стабилизируется за счет образования водородных связей между группами ОН и NH. а также за счет перестройки их структур. Особый интерес



представляло изучение кинетики и механизма второй и третьей стадий, которые могут протекать по нескольким направлениям:

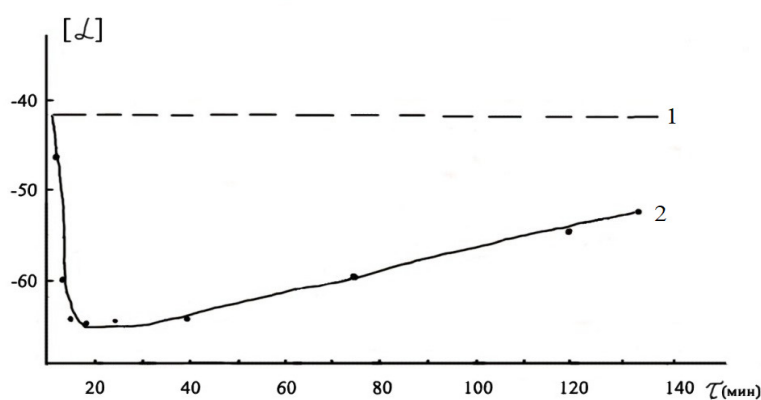
Основания Шиффа с L-α-гистидином фрагментом на третьей стадии происходит декарбоксилирование с образованием хи-

ноидной структуры, гидролиз которой приводит к образованию пиридоксаля и гистамина. Для доказательства предложенных схем были синтезированы соответствующие основания Шиффа. При конденсации пиридоксаля с L-α-гистидином был выделен и идентифицирован гистамин.



Согласно предложенной схеме конденсация пиридоксаля с L- $\alpha$ -гистидином в качестве промежуточного продукта образуется аминспирты с возникновением в них хиральных центров.

Были проведены кинетических измерения методом поляриметрии. На (рис. 2) показано изменение удельного угла вращения смеси 0,04 М растворов пиридоксаля с L- $\alpha$ -гистидином.



**Рис.2.** Измерение удельных углов вращения 0,04 М смеси растворов пиридоксаль гидрохлорида и L- $\alpha$ -гистидина во времени (70% этанольно-водный буферный раствор, T 20°C, pH 6.95; 1-смесь пиридоксаль гидрохлорида и L- $\alpha$ -гистидина ; 2- раствор L- $\alpha$ -гистидина)

продуктов (тетраэдрического интермедиа-та) и конечных продуктов (пиридоксаля и гистамина) путем оптимизации их энергетических и геометрических параметров. (изменение абсолютных значений удельных углов вращения во времени). На первый взгляд, это предположение противоречит предложенной схеме механизма конденсации аминокислот с пиридоксалем. Дегидратация аминспиртов должна приводить к уменьшению концентрации аминспиртов, что должно привести к уменьшению количества хиральных центров, а следовательно к изменению абсолютного значения удельного угла вращения. Можно предположить, что величина удельного угла вращения продуктов взаимодействия пиридоксаля с L- $\alpha$ -гистидином, зависит не только от их концентрации, но и в большей степени от

Эти результаты можно объяснить:

1.- присоединение NH<sub>2</sub> –группы аминокислот происходит не перпендикулярно плоскости карбонильной группы пиридоксаля, а в вдоль ее плоскости с образованием аминспирта и появлением хиральных центров. 2.-далее, по видимому, происходит поворотная изомерия имидозольного фрагмента (индукционный участок кинетической кривой с образованием промежуточных

пространственного расположения функциональных групп при хиральном центре

Для выяснения этого сложного вопроса были рассмотрены структуры продуктов взаимодействия пиридоксаля с L- $\alpha$ -гистидином с учетом оптимизации их геометрических и энергетических параметров в программе Nupur Chem - аминспиртов и оснований Шиффа. Структура этих продуктов рассматривалась путем расположения фрагмента пиридинового кольца ~90° от глаза наблюдателя (совмещение его атомов углерода в орто- и мета- положениях). Анализ рассматриваемых структур, показал, что OH – группа располагается приблизительно в одной плоскости пиридинового кольца (условно “левая часть”), CH<sub>2</sub>OH – группа ввиду нелинейности ее структуры выступает за

плоскость пиридинового кольца (условно “правая часть”). Эта группа в аминок спиртах находится слева. Такая структура аналогична структуре аминок спирта -промежуточного продукта взаимодействия D- $\alpha$ - аланина с пиридоксальем в процессе его декарбоксиирования.

### **Экспериментальная часть**

В качестве объектов исследования использовали гидрохлорид пиридоксаля фирмы Ferak Berlin и аминокислота – L- $\alpha$ -гистидин – фирмы Reanal. Буферные растворы готовили по общепринятой методике. Кинетику конденсации измеряли на спектрофотометре СФ-26 «ЛОМО». Реакционные смеси термостатировали при помощи термостата УН-4 с точностью  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Навески эквимольных количеств пиридоксаля и аминокислот в растворя-

ли в водно-спиртовых буферных растворах и выдерживали при заданной температуре в течение 30 мин. За начало реакции принимали момент смешения термостатированных растворов реагентов. Кинетические измерения проводили в термостатированных кюветах толщиной 1.008 мм. Поскольку УФ спектры растворов гидрохлорида пиридоксаля изменяются в зависимости от растворителя и рН среды, в кюветы сравнения заливали соответствующие растворители или буферные растворы. Константы скорости конденсации пиридоксаля с аминокислотами рассчитывали по компьютерной программе по уравнениям первого и второго порядка для обратимых и необратимых реакций [9]. Исходные, промежуточные и конечные продукты синтезированы по методикам работ [3-9] и идентифицированы методами элементного анализа, УФ и ИК спектроскопии ((Nicolet Avatar 370 PGTS, табл. KBr).

### **Литература**

1. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биорганическая химия. – М.: Медицина, –1991. – 288с.
2. Мецлер Д. Биохимия. – М.: Мир, – 1980. Т. 2. – 527с.
3. Пицугин Ф.В., Шаршеналиева З.Ш. // Биохимия. –1988. Т. 53. № 9. – 1509с.
4. Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // ЖОХ. – 2005. Т. 75. Вып. 9. – 1538 с.
5. Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // ЖОХ.– 2008. Т. 78. Вып. 6. – 997 с.
6. Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // ЖОХ. – 2009. Т. 79. Вып. 1. – 120 с.
7. Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // ЖОХ. – 2010. Т. 80. Вып. 9. – 1518 с.
8. Пицугин Ф.В., Тулебердиев И.Т. // ЖОХ. – 2012. Т. 82. Вып. 7. – 1168 с.
9. Лейдлер К. Кинетика органических реакций. – М.: Мир, – 1966. – 31 с.