

ПРО(АНТИ)ОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ Fe^{2+} И Cu^{2+}

© 2020 г. О. А. Милач^а, И. В. Мельситова^а, И. Л. Юркова^{а,б,*}

^а Белорусский государственный университет, ул. Ленинградская 14, Минск, 220030 Республика Беларусь

^б Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220030 Республика Беларусь

*e-mail: yurkovail@tut.by

Поступило в Редакцию 10 февраля 2020 г.

После доработки 10 февраля 2020 г.

Принято к печати 16 февраля 2020 г.

С помощью флуоресцентного зонда (терефталевой кислоты) оценена способность аминокислот и их производных акцептировать и/или содействовать образованию радикалов HO^\bullet в системах $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$, $\text{Fe}^{2+}(\text{ЭДТА})\text{-H}_2\text{O}_2$. В диапазоне концентраций 0.005–30 мМ. по увеличению значения IC_{50} аминокислоты располагаются в ряд: $\text{Trp} < \text{Phe} \leq \text{Met} \leq \text{His} < \text{Gly} \leq \text{Glu} < \alpha\text{-Ala} < \text{Cys} \ll \beta\text{-Ala} \ll \text{Tau}$ (система с ионами Cu^{2+}); $\text{His} \leq \text{Met} < \text{Trp} \leq \text{Cys} \ll \beta\text{-Ala} < \text{Tau} \leq \text{Glu} < \alpha\text{-Ala} < \text{Gly}$ (система со свободными ионами Fe^{2+}). В присутствии меди(II) цистеин и его производные, глутамин, α -аланин и гистидин (S) способствуют образованию HO^\bullet и действуют как антиоксиданты при молярном соотношении $\text{S}:\text{Cu}^{2+} > 2:1$, а для гистидина при $\geq 1:1$. Цистеин является прооксидантом в системе с $\text{Fe}^{2+}\text{-ЭДТА}$.

Ключевые слова: аминокислота, гидроксильный радикал, прооксидант, ион $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$, флуоресцентный зонд, радикал-акцепторная активность

DOI: 10.31857/S0044460X2006008X

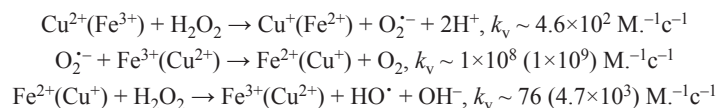
Аминокислоты и их производные являются частью антиоксидантной системы организма для защиты клеток от окислительного стресса [1, 2]. Последний развивается в результате нарушения баланса оксиданты–антиоксиданты и характеризуется чрезмерным накоплением активных форм кислорода ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HClO , HO^\bullet) [2]. Активные формы кислорода способны индуцировать повреждение компонентов клеток и органов в целом. Окислительный стресс играет ключевую роль в развитии многих патологий (воспаления, атеросклероз, инсульт, инфаркт, диабет и др.) [1, 2].

Среди активных форм кислорода гидроксильный радикал (HO^\bullet) – самая реакционноспособная

и токсичная частица [$E^\circ(\text{HO}^\bullet, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}) = 2.73 \text{ В}$, $E^{\circ'} = 2.31 \text{ В}$ при $\text{pH} = 7.25$], известная в настоящее время [2]. Радикалы HO^\bullet инициируют процессы деструкции важнейших биомолекул с высокой скоростью ($10^9\text{--}10^{10} \text{ М.}^{-1}\text{с}^{-1}$) и играют решающую роль в развитии патологий [2, 3]. В настоящее время нет никакой известной ферментативной реакции, способной деактивировать HO^\bullet *in vivo*. Один из путей образования HO^\bullet в организме – это разложение H_2O_2 , катализируемое ионами переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^+ и др.) (схема 1) [2, 3].

Увеличение свободных (не связанных с белками или слабо связанных с аминокислотами) ионов меди и железа вследствие нарушения гомеостаза

Схема 1.



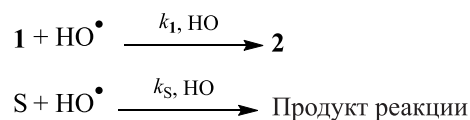
коррелирует с развитием заболеваний (сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, рак и др.), патогенез которых сопряжен с образованием активных форм кислорода [4].

Роль аминокислот и их производных в регулировании активных процессов, опосредованных активными формами кислорода, в биосистемах интенсивно исследуется [1, 2]. Однако, несмотря на большой накопленный материал, детальный механизм вовлечения аминокислот и их производных в регулирование свободно-радикальных реакций, в частности в условиях $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$ -опосредованного генерирования HO^\bullet , остается открытым. В присутствии ионов переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) аминокислоты самостоятельно или в сочетании с другими веществами способны как ингибировать, так и интенсифицировать процессы окисления в клетках [1, 2, 5–9]. Исследования антиоксидантных свойств аминокислот и их производных проводятся при различных условиях *in vitro/vivo*, зачастую данные противоречивы, их трудно сопоставить и прогнозировать действие отдельных аминокислот.

Задачей данной работы было оценить способность различных аминокислот и их производных акцептировать и/или содействовать образованию радикалов HO^\bullet в присутствии как ионов Fe^{2+} , так и Cu^{2+} при одинаковых условиях. Для тестирования был выбран метод флуоресцентных зондов, базирующийся на использовании терефталевой кислоты. Данный метод обладает высокой чувствительностью и прост в исполнении. Для генерирования HO^\bullet использовали следующие редокс-системы: $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})-\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{Fe}^{2+}/\text{ЭДТА}-\text{H}_2\text{O}_2$. Концентрационный диапазон тестируемых соединений находился в области 5×10^{-6} – 2×10^{-2} моль/л, в отдельных случаях он расширялся.

Терефталевая кислота является специфичным и высокочувствительным детектором HO^\bullet ($\sim 10^{-9}$ М.), она не реагирует с другими активными формами кислорода (O_2^- , $^1\text{O}_2$, H_2O_2) [10]. Вследствие симметричности молекулы терефталевая кислота ($\text{p}K_{\text{a}1} = 3.51$, $\text{p}K_{\text{a}2} = 4.82$) взаимодействует с HO^\bullet с образованием только одного моногидроксилированного изомера – 2-гидрокситерефталата **2**. Данный продукт является стабильным и в отличие от терефталевой кислоты обладает флуоресценцией ($\lambda_{\text{ex}} = 315$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 418$ нм). В соответствии со сте-

Схема 2.



хиометрией реакции концентрация радикалов HO^\bullet прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции 2-гидрокситерефталата.

Аминокислоты и их производные могут различным образом влиять на уровень HO^\bullet в тест-системе, включающей ионы $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$ и терефталевую кислоту. С одной стороны, аминокислоты, взаимодействуя с $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$, могут влиять на способность редокс-систем генерировать HO^\bullet . С другой стороны, они могут акцептировать образующиеся HO^\bullet , и, тем самым, конкурировать с терефталевой кислотой **1** за их присоединение (схема 2). В конечном итоге эти процессы будут приводить к изменению концентрации 2-гидрокситерефталата **2**.

Про/антиоксидантные свойства веществ оценивали по их способности влиять на кинетику гидроксилирования терефталевой кислоты и индексу IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования).

Действие аминокислот и их производных в присутствии ионов меди(II). В условиях Cu^{2+} -опосредованного генерирования HO^\bullet наибольшие различия во влиянии аминокислот и их производных на окисление терефталевой кислоты выявлено на начальном участке исследованного концентрационного диапазона. Наибольшей HO^\bullet -акцептирующей способностью обладают ароматические аминокислоты Trp и Phe. В их присутствии значительно снижается выход 2-гидрокситерефталата и они обладают низкими индексами IC_{50} (см. таблицу).

Среди серосодержащих аминокислоты лучшей антирадикальной активностью обладает Met и его сульфоксид. В присутствии Cys ($c = 5 \times 10^{-6}$ – 1×10^{-4} моль/л) и его N-ацетилированного аналога (NAC) гидроксилирование терефталевой кислоты усиливается в значительной степени. Это свидетельствует о том, что уровень HO^\bullet в системе возрастает. В указанном диапазоне стимулирующим эффектом обладают также Glu и протеиногенный $\alpha\text{-Ala}$. Увеличение выхода 2-гидрокситерефталата наблюдается и в присутствии His. Однако активирующее действие His проявляется в более узкой

Индексы IC₅₀ исследованных соединений и константы скоростей реакций с гидроксильным радикалом

Соединение	IC ₅₀ , ммоль/л			k _{HO·} , М. ⁻¹ ·с. ⁻¹ [3, 11]
	Cu ²⁺ -H ₂ O ₂ (0.05:5 ммоль/л)	Fe ²⁺ -H ₂ O ₂ (0.1:1 ммоль/л)	Fe ²⁺ /ЭДТА-H ₂ O ₂ (0.1:0.1:1 ммоль/л)	
Trp	0.015 ± 0.001	0.072 ± 0.008	0.071 ± 0.007	1.3×10 ¹⁰ (pH = 6.0–8.5)
Phe	0.071 ± 0.006	–	–	6.5×10 ⁹ (pH = 5.8–8)
Met	0.075 ± 0.006	0.047 ± 0.005	–	8.3×10 ⁹ (pH = 6–7)
MetSO	0.046 ± 0.004	0.083 ± 0.008	–	1×10 ¹⁰
His	0.078 ± 0.007	0.038 ± 0.004	0.280 ± 0.030	5×10 ⁹ (pH = 6.0–7.0)
Gly	0.158 ± 0.015	24.8 ± 1.70	> 30	1.7×10 ⁷ (pH = 5.8–6.0)
Glu	0.189 ± 0.021	7.88 ± 0.46	1.55 ± 0.14	2.3×10 ⁸ (pH = 6–7)
α-Ala	0.241 ± 0.026	9.26 ± 0.74	9.97 ± 0.80	7.7×10 ⁷ (pH = 5.5–6.8)
Cys	0.69 ± 0.08	0.082 ± 0.008	3.28 ± 0.29	3.5×10 ¹⁰ , 4.7×10 ¹⁰ (pH = 7)
NAC	1.16 ± 0.093	0.099 ± 0.01	1.99 ± 0.18	1.36×10 ¹⁰
β-Ala	5.67 ± 0.39	3.42 ± 0.32	5.25 ± 0.47	–
Tau	>30	7.37 ± 0.59	–	2.4×10 ⁶ –1.4×10 ⁷
GSH	0.111 ± 0.010	0.034 ± 0.003	0.739 ± 0.072	1.3×10 ¹⁰ (pH = 5.5)
GSSG	0.024 ± 0.002	0.222 ± 0.024	0.466 ± 0.050	9.6×10 ⁹ (pH = 7)
Cyst	0.344 ± 0.035	–	–	–
Car	0.073 ± 0.007	0.041 ± 0.004	0.289 ± 0.030	4.0×10 ⁹
NaN ₃	0.051 ± 0.005	0.044 ± 0.004	0.046 ± 0.005	1.2×10 ¹⁰ (pH = 7.9–13)
DMCO	0.035 ± 0.004	–	–	7.0×10 ⁹

области концентраций (5×10^{-6} – 1×10^{-5} моль/л) и он имеет, в отличие от Cys, Glu и α-Ala, более низкий уровень IC₅₀. Все аминокислоты, обнаруживающие прооксидантный эффект, работают как антиоксиданты при молярном соотношении аминокислота:Cu²⁺ >2:1, за исключением His, для которого оно ≥1:1. HO·-Акцепторные свойства Gly проявляются также при соотношении аминокислота:Cu²⁺ > 2:1, а непротеиногенного β-Ala – при соотношении >10:1. Индекс IC₅₀ для β-Ala в >20 раз выше, чем для α-Ala. Сульфокислота Tau, входящая в состав белков, не влияет на гидрокселирование терефталевой кислоты.

Значимую роль в регулировании процессов, опосредованных активными формами кислорода, играют такие производные аминокислот, как карнозин (Car) и глутатион (GSH) [1, 2]. В работе выявлено, что Car (β-аланил-L-гистидин) эффективно снижает уровень HO· в той же области концентраций ($>1 \times 10^{-5}$ моль/л), где проявляются аналогичные свойства His. Совокупность резуль-

татов для Car, His и β-Ala указывают на важность наличия пептидной связи для проявления антирадикальных свойств дипептида.

GSH (L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин) при $c = 5 \times 10^{-6}$ – 5×10^{-5} моль/л интенсифицирует окисление терефталевой кислоты с образованием 2-гидрокситерефталата. При этом его окисленная форма (GSSG) не обладает таким эффектом. Для дисульфида цистамина (Cyst), известного радиопротектора, прооксидантного действия также не наблюдали. Из полученных данных следует, что влияние GSH на гидрокселирование терефталевой кислоты, как и для свободных аминокислот, зависит от соотношения пептид:Cu²⁺. Максимальный прооксидантный эффект GSH наблюдается при соотношении 1:1, а заметный антиоксидантный – при >2:1. Величины его индекса IC₅₀ составляют 0.056, 0.111, 0.160 и 0.210 ммоль/л соответственно для $c_{Cu^{2+}} = 0.025, 0.05, 0.075$ и 0.1 ммоль/л при $[H_2O_2] = const$. Прооксидантные свойства GSH коррелируют с таковыми для Cys и Glu, входящи-

ми в его состав. Несмотря на свое активирующее действие в малых дозах, GSH имеет низкий индекс IC_{50} , сравнимый с таковым для Car.

В Cu^{2+} -содержащей системе по увеличению значений IC_{50} аминокислоты располагаются в следующая ряд, включающий референтный азид натрия: $Trp < NaN_3 \leq Phe \leq Met \leq His < Gly \leq Glu < \alpha-Ala < Cys \ll \beta-Ala \ll Tau$.

В соответствии с работами [3, 11], по снижению константы скорости реакции с гидроксильным радикалом ($k_{HO\cdot}$) исследованные аминокислоты располагаются следующим образом: $Cys \geq Trp \geq NaN_3 > Met > His \approx Phe \gg Glu > \alpha-Ala > Gly > Tau$ (см. таблицу). Сопоставление величин $k_{HO\cdot}$ и IC_{50} исследованных аминокислот указывают на то, что с их участием в условиях Cu^{2+} -опосредованного образования $HO\cdot$ протекают сложные процессы. Полученные данные обращают внимание на то, что нужно учитывать не только скорость взаимодействия аминокислоты с $HO\cdot$, но также их способность влиять на соотношение $Cu^{2+}:Cu^+$ и координировать ионы меди таким образом, что это может воздействовать на каталитическую активность последних в реакциях с H_2O_2 . Так, отсутствие $HO\cdot$ -акцепторной активности Tau согласуется с его низкой константой ($k_{HO\cdot}$) и данными работ [9, 12], указывающими на то, что он слабо ингибирует свободно-радикальную деструкцию биомолекул, инициированную $HO\cdot$. Однако в случае Cys, Gly и $\alpha-Ala$ такой корреляции нет, хотя в условиях γ -радиолиза первый проявляет высокие $HO\cdot$ -акцепторные свойства в отличие от простейших аминокислот [2]. Известно, что биотиолы – эффективные радиопротекторы [2].

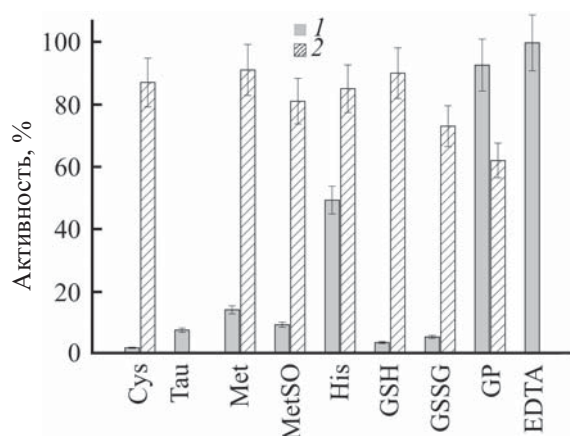
Прооксидантный эффект аминокислот и производных можно объяснить нуклеофильными свойствами их функциональных групп, способных восстанавливать $Cu(II)$ до $Cu(I)$ и, тем самым, содействовать ускорению разложения H_2O_2 и, следовательно, повышению уровня $HO\cdot$. Наибольшее прооксидантное действие проявляют Cys и его производные, несущие SH-группу. Это согласуется с двоякой ролью биотиолов в регулировании свободнорадикальных процессов [5, 6, 9]. His за счет имидазольной группы также может служить нуклеофилом и способствовать восстановлению Cu^{2+} [13], и, тем самым, активизировать процессы деструкции, что согласуется с данными работы

[14]. Надо отметить, что дисульфид GSSG, в отличие от GSH, обладает более высокой антирадикальной активностью. В работе [15] показано, что в условиях Cu^+ -опосредованного генерирования $HO\cdot$ цистин и GSSG более эффективны в ингибировании ДНК-повреждений, чем Cys и GSH.

Полученные данные указывают на то, что свой вклад в протекторное действие аминокислоты вносит их способность связывать ионы Cu^{2+}/Cu^+ в комплексы [1, 16–19]. Cys и GSH образуют комплексы как с Cu^{2+} , так и с Cu^+ , причем более стабильные с восстановленной медью [16]. Антиоксидантный эффект Gly, $\alpha-Ala$ и Glu, несмотря на низкие значения $k_{HO\cdot}$, видимо, связан с их хорошей аффинностью к ионам Cu^{2+}/Cu^+ [17–19]. Gly, $\alpha-Ala$ и His в низких концентрациях обладают в ~3–4 раза большей Cu^{2+} -хелатирующей активностью, чем Tau и $\beta-Ala$ [20]. His и Car (0.5–5 ммоль/л) хорошо ингибировали H_2O_2 – $CuSO_4$ –аскорбат-индуцированное окисление ДНК, а $\beta-Ala$ был неэффективен [7]. Антиоксидантные свойства MetSO снижаются на 25% при переходе от систем с несвязанными Cu^+ к хелатированным 2,2'-бипиридином [21].

Действие аминокислот и пептидов зависит от их молярного соотношения с Cu^{2+} , что может быть связано с процессами комплексообразования. Увеличение количества Cys или GSH в 2 раза в сравнении с $Cu(I)$ сопровождается образованием стабильных комплексов, что препятствует участию $Cu(I)$ в реакции Фентона (схема 1) [16, 22, 23].

Действие аминокислот и их производных в присутствии ионов железа(II). В условиях Fe^{2+} – H_2O_2 -опосредованного окисления терефталевой кислоты влияние тестируемых соединений отличается от их действия в присутствии Cu^{2+} (см. таблицу). Важным отличием является то, что ни одна аминокислота не обнаруживает прооксидантного эффекта. Самый низкий индекс IC_{50} характерен для His, он обладает высокой антирадикальной активностью при данных условиях. Хотя, согласно работе [8], в присутствии аскорбата His ускорял деструкцию биомолекул, индуцированную Fe^{2+} – H_2O_2 . Cys и его производные являются эффективными $HO\cdot$ -акцепторами, а Glu, $\alpha-Ala$ и Gly теряют свою активность, что отражается в их высоких значениях IC_{50} . Среди пептидов отличие наблюдается только для GSH, в диапазоне 5×10^{-6} – 5×10^{-4} моль/л он более эффективен, чем его окисленная форма.



Способность тестируемых соединений (S) хелатировать Fe^{2+} (1, [S] = 10 ммоль/л) и ингибировать образование 2-гидрокситерефталата 2 в тест-системе терефталевая кислота– Fe^{2+} – H_2O_2 (0.06:0.1:1 ммоль/л) (2, [S] = 0.5 ммоль/л).

В системе, содержащей свободные Fe^{2+} , по увеличению индекса IC_{50} аминокислоты располагаются в следующий ряд: $\text{His} \leq \text{NaN}_3 \leq \text{Met} < \text{Trp} \leq \text{Cys} \ll \beta\text{-Ala} < \text{Tau} \leq \text{Glu} < \alpha\text{-Ala} < \text{Gly}$.

HO^\bullet -Акцепторные свойства аминокислот исследовали также в системе Fe^{2+} – H_2O_2 , в которую вводили этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), образующую комплекс Fe^{2+} /ЭДТА ($\lg K = 14.3$). Добавка ЭДТА, с одной стороны, повышает эффективность системы, т. е. усиливает каталитический эффект железа(II) в реакции Фентона (схема 1) $\{E^\circ(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) = 0.77 \text{ В}, E^\circ(\text{Fe}^{3+}\text{-ЭДТА}/\text{Fe}^{2+}\text{-ЭДТА}) = 0.13 \text{ В} [2]\}$, а с другой – препятствует связыванию ионов железа с тестируемыми соединениями.

Согласно полученным данным, His и Cys эффективнее в системе со свободными ионами Fe^{2+} , что может указывать на вклад в их антиоксидантное действие связывания $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ [24, 25]. В нашем эксперименте Fe^{2+} -хелатирующая активность His, в отличие от других аминокислот, наилучшим образом коррелирует с антирадикальной (см. рисунок). Согласно данным работы [24], His эффективен в связывании Fe(III) , а Glu нет. Gly и $\alpha\text{-Ala}$ способны образовывать комплексы с ионами железа, хотя и менее прочные, чем с ионами меди [26]. Однако данные аминокислоты не проявляют значимой активности в присутствии Fe^{2+} . Надо отметить, что образование комплексов аминокислоты с ионами металлов может как усиливать (проокси-

дантный эффект), так и ослаблять (антиоксидантный) каталитическую активность металла.

Наиболее существенное отличие в действии аминокислот в сравнении с системой со свободными ионами Fe^{2+} выявлено для Cys и его N-ацетилированного аналога. Данные тиолы способствуют гидроксигированию терефталевой кислоты в диапазоне концентраций 5×10^{-6} – 1×10^{-3} моль/л, заметный ингибирующий эффект наблюдали при $c = 5 \times 10^{-3}$ моль/л. GSH не оказывает прооксидантного действия, однако протекторный эффект, схожий по силе в системе Fe^{2+} – H_2O_2 , оказывает при увеличении концентрации более чем в 10 раз.

Прооксидантное действие биотиолов (RSH) можно объяснить нуклеофильными свойствами сульфгидрильной группы. Перенос электрона в водной среде от Cys и GSH к ионам железа(III) при физиологических условиях протекает очень медленно [2]. Активность тиолов коррелирует с $\text{p}K_a$ -значениями их SH-групп (GSH 9.2, Cys 8.5, $\text{pH} = 7.4$). Окислительная модификация низкомолекулярных тиолов предпочтительна при повышении их нуклеофильных свойств путем перевода в тиолатную форму (RS^-). В выбранных условиях эксперимента, по-видимому, возможно прямое взаимодействие Cys с комплексом Fe^{3+} /ЭДТА, что приводит к восстановлению ионов Fe^{3+} и, тем самым, возвращает их в каталитический цикл разложения H_2O_2 . Активирующее действие GSH и Cys на Fe^{2+} /ЭДТА-опосредованный свободнорадикальный процесс наблюдали в работе [9], хотя, согласно данным [6], трипептид и N-ацетилированный цистеин ускоряли пероксидное окисление липидов, индуцированное нехелатируемыми ионами Fe^{2+} .

Таким образом, методом флуоресцентных зондов выявлено различие в антиоксидантном действии аминокислот и их производных в зависимости от того, какие ионы Fe^{2+} (Cu^{2+}) опосредуют образование радикалов HO^\bullet . Отдельные аминокислоты и их производные – эффективные промоторы или протекторы только в присутствии Cu^{2+} . Данные простого экспресс-анализа позволяют сделать вывод о том, что в присутствии ионов Fe^{2+} (Cu^{2+}) про(анти)оксидантное действие аминокислот и пептидов обусловлено балансом их HO^\bullet -акцепторных, восстановительных и комплексообразующих свойств. Полученные результаты полезны для раз-

работки эффективных антиоксидантов, нутрицевтиков, лекарственных препаратов на основе аминокислот и понимания детального механизма их действия при определенных условиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *L*-цистеин (Cys), *N*-ацетил-*L*-цистеин (NAC), таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) (Tau), *L*-метионин (Met), *L*-метионин сульфоксид (MetSO), *L*-гистидин (His), *L*-триптофан (Trp), глицин (Gly), *L*-фенилаланин (Phe), *L*-глутаминовую кислоту (Glu), α -аланин (α -Ala), β -аланин (β -Ala), карнозин (Car), глутатион восстановленный (GSH) и окисленный (GSSG), динатриевую соль глицеро-2-фосфата (GP), терефталевую кислоту, феррозин (Fz) производста фирмы «Sigma-Aldrich» (Германия). Азид натрия, гидропероксид, диметилсульфоксид, цистамин, соли металлов ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и натриевая соль ЭДТА – коммерческие продукты (ЗАО «Вектон», Россия). Все использованные в работе реактивы и растворители имели аналитическую степень чистоты. Водные растворы готовили с использованием деионизированной воды.

Спектры флуоресценции в диапазоне 350–550 нм получали на спектрофлуориметре Solar CM2203. Оптическое поглощение проб измеряли на спектрофотометре Specord S600.

Определение антирадикальной активности соединений. Тест-система для исследования HO^\bullet -акцепторной способности соединений имела следующий состав: терефталевая кислота– Cu^{2+} (Fe^{2+} , Fe^{2+} /ЭДТА)– H_2O_2 , фосфатно-солевой буфер (PBS, 10 ммоль/л, pH = 7.4). Общий объем реакционной системы составлял 2 мл. Изначально готовили исходные концентрированные растворы реагентов, затем их аликвоты добавляли в тест-систему для достижения необходимых концентраций компонентов. Исходный раствор терефталевой кислоты ($c = 1 \times 10^{-2}$ моль/л) готовили путем растворения 0.0118 г кислоты в 25 ммоль/л растворе NaOH. В тест-системе конечная концентрация терефталевой кислоты составляла 6×10^{-5} моль/л.

При тестировании соединений строго соблюдали следующий порядок добавления растворов реагентов: PBS, терефталевая кислота, тестируемое соединение, соль металла, H_2O_2 . Для достижения однородности во всем объеме пробы после добав-

ления каждого компонента растворы тщательно перемешивали на приборе Vortex Mixer. Далее тест-системы инкубировали при комнатной температуре в течение 5 или 9 мин. Время с момента последнего перемешивания до измерения в каждой серии было одинаковым и отмечалось строго по секундомеру. Для определения длительности инкубирования теста изучали кинетическое поведение реакции образования 2-гидрокситерефталата. После введения H_2O_2 в реакционную смесь терефталевая кислота– M^{2+} интенсивность флуоресценции при 418 нм записывали как функцию времени.

Данные оценивали, используя метод конкурирующих реакций. Терефталевая кислота **1** и тестируемое соединение (S) конкурируют за взаимодействие с гидроксильным радикалом (схема 2). Сигнал флуоресценции (F) измеряли как функцию концентрации тестируемого соединения ($[I] = \text{const}$) и строили графики в координатах F – $[S]$.

Так как флуоресцентный сигнал в системе пропорционален только концентрации 2-гидрокситерефталата **2**, то для обработки экспериментальных результатов использовали адаптированное уравнение Штерна–Фольмера (1).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{k_{S, \text{HO}}[S]}{k_{I, \text{HO}}[I]} \quad (1)$$

Здесь $[S]$ и $[I]$ – концентрации тестируемого соединения и терефталевой кислоты соответственно; F_0 и F – интенсивность сигнала флуоресценции 2-гидрокситерефталата при $\lambda_{\text{em}} = 418$ нм в отсутствие и в присутствии тестируемого соединения соответственно.

Для расчета индекса IC_{50} уравнение (1) перегруппировали и преобразовали в логарифмическую зависимость, а затем получали прямую в координатах: $\log[F_0/F - 1]$ – $\log[S]$. Концентрацию тестируемого вещества, при которой наблюдается уменьшение флуоресценции по сравнению с контролем в два раза (индекс IC_{50}), получали при значении $\log(F_0/F - 1) = 0$ [если $F = 1/2F_0$, то $\log(F_0/F - 1) = 0$]. В качестве контроля использовали NaN_3 , что объясняется его устойчивыми антирадикальными свойствами в условиях Fe^{2+} (Cu^{2+})-опосредованного генерирования HO^\bullet [2].

Для расчета относительной константы скорости реакции ($k_{S, \text{HO}}$) тестируемого соединения (S) с HO^\bullet строили графики в координатах:

$(F_0/F - 1) - ([S]/[I])$. По тангенсу угла наклона прямой $(F_0/F - 1) - ([S]/[I])$, равному $k_{S,OH}/(k_{I,OH} \cdot [I])$, рассчитывали величину $k_{S,OH}$ с учетом того, что $k_{I,OH} = 4.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [10]. Рассчитанные в данной работе значения $k_{S,OH}$ для NaN_3 , ДМСО, Тгр и Тау, равные 8.6×10^9 , 5.2×10^9 , 1.06×10^{10} , $1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ соответственно, хорошо согласуются с литературными данными (см. таблицу). Это дополнительно указывает на то, что выбранный метод тестирования хорошо подходит для экспресс-оценки антирадикальной активности соединений при заданных условиях.

Ингибирующую активность соединений (%) рассчитывали по уравнению (2).

$$A = \frac{F_0 - F}{F_0} \times 100\%. \quad (2)$$

Определение Fe^{2+} -хелатирующей способности соединений. Способность соединений хелатировать ионы Fe^{2+} оценивали в соответствии с методикой, основанной на образовании устойчивого водорастворимого комплекса между феррозином (Fz) и Fe^{2+} (pH = 4–9) [27]. Тестируемые соединения конкурируют с Fz за связывание Fe^{2+} , в результате чего уменьшается количество окрашенного комплекса Fe(II)Fz_3 .

К 0.2 мл образца добавляли 0.2 мл раствора FeSO_4 (5×10^{-5} моль/л). Реакцию инициировали добавлением 0.2 мл раствора феррозина (2.5×10^{-4} моль/л). Смесь хорошо встряхивали и оставляли при комнатной температуре в темноте на 15 мин. После достижения в смеси равновесия измеряли оптическое поглощение пробы при $\lambda = 562$ нм. Глицеро-2-фосфат и ЭДТА были использованы в качестве стандартных соединений.

Хелатирующую активность (%) соединений рассчитывали по уравнению (3).

$$A = \frac{A_k - A_0}{A_k} \times 100\%. \quad (3)$$

Здесь A_k и A_0 – величина оптической плотности комплекса Fe(II)Fz_3 соответственно без добавок и в присутствии исследуемого образца.

Статистический анализ. Для обработки полученных экспериментальных результатов применяли методы математической статистики, включая статистические функции программ Excel и Origin 8. Достоверность полученных результатов контролировали с помощью t-теста Стьюдента. В каждой

экспериментальной серии проводили 3–5 параллельных опытов. Оценку линейной связи между количественными переменными проводили с помощью коэффициента Пирсона. Гипотезу о наличии достоверной положительной корреляции считали подтвержденной при $R^2 = 0.97–0.99$ ($p < 0.05$).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. // *Curr. Pharm. Des.* 2004. Vol. 10. P. 1677. doi 10.2174/1381612043384655
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*, fourth edition. Oxford: University press, 2012. 851 p.
3. Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B. // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1988. Vol. 17. N 2. P. 513. doi 10.1063/1.555805
4. Valko M., Jomova K., Rhodes C.J., Kuca K., Musilek K. // *Arch. Toxicol.* 2016. Vol. 90. P. 1. doi 10.1007/s00204-015-1579-5
5. Yin J.-J., Fu P.P., Lutterodt H., Zhou Y.-T., Antholine W.E., Wamer W. // *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60. P. 2554. doi 10.1021/jf204724w
6. Sagrista M.L., Garcia A.E., Africa De Madariaga M., Mora M. // *Free Rad. Res.* 2002. Vol. 36. N 3. P. 329. doi 10.1080/10715760290019354
7. Mozdzan M., Szemraj J., Rysz J., Nowak D. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 96. P. 352. doi 10.1111/j.1742-7843.2005.pto_03.x
8. Шендикова Е.Н., Мельситова И.В., Юркова И.Л. // *Химия высоких энергий.* 2016. Т. 50. N 4. С. 260.; Shendikova E.N., Mel'sitova I.V., Yurkova I.L. // *High Energy Chem.* 2016. Vol. 50. N 4. P. 249. doi 10.7868/S0023119316040173
9. Шендикова Е.Н., Мельситова И.В., Юркова И.Л. // *Химия высоких энергий.* 2017. Т. 51. N 5. С. 380.; Shendikova E.N., Mel'sitova I.V., Yurkova I.L. // *High Energy Chem.* 2017. Vol. 51. N 5. P. 363. doi 10.7868/S002311931705014X
10. Page S.E., Arnold W.A., McNeill K. // *J. Environ. Monit.* 2010. Vol. 9. N 12. P. 1658. doi 10.1039/c0em00160k
11. Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J. // *Biochem J.* 1988. Vol. 256. P. 251. doi 10.1042/bj2560251
12. Shi X., Flynn D.C., Porter D.W., Leonard S.S., Vallyathan V., Castranova V. // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1997. Vol. 27. P. 365.

13. Christensen A.M., Schaefer J., Kramer K.J., Morgan T.D., Hopkins T.L. // J. Am. Chem. Soc. 1991. Vol. 113. P.6799. doi 10.1021/ja00018a013
14. Gutierrez-Correa J., Stoppani A.O. // Free Rad. Res. Vol. 27. P. 543. doi 10.3109/10715769709097858
15. Battin E.E., Brumaghim J.L. // J. Inorg. Biochem. 2008. Vol. 102. P. 2036. doi 10.1016/j.jinorgbio.2008.06.010
16. Fernanda M., Leal C., van den Berg C.M.G. // Aquatic Geochem. 1998. Vol. 4. P. 49. doi 10.1023/A:1009653002399
17. Cerda B.A., Wesdemiotis C. // J. Am. Chem. Soc. 1995. Vol. 117. P. 9734. doi 10.1021/ja00143a017
18. Senapati U., Mandal B., Bankura K.P. // Rasayan J. Chem. 2017. Vol. 10. P. 981. doi 10.7324/RJC.2017.1031798
19. Umadevi P., Senthilkumar L. // RSC Adv. 2014. Vol. 90. P. 49040. doi 10.1039/C4RA08155B
20. Wu H.-C., Shiau C.-Y., Chen H.-M., Chiou T.-K. // J. Food Drug Anal. 2003. Vol. 11. P. 148.
21. Ramoutar R.R., Brumaghim J.L. // Main Group Chem. 2007. Vol. 6. P. 143. doi 10.1080/10241220802012387
22. Hanna P.M., Mason R.P. // Arch. Biochem. Biophys. 1992. Vol. 295. P. 205. doi 10.1016/0003-9861(92)90507-s
23. Spear N., Aust S.D. // Arch Biochem Biophys. 1995. Vol. 317. P. 142. doi 10.1006/abbi.1995.1146
24. Nair N.G. Perry G.S., Smith M.A., Reddy V.P. // J. Alzheimer's Dis. 2010. Vol. 20. P. 57. doi 10.3233/JAD-2010-1346
25. Vera-Aviles M., Vantana E., Kardinasari E., Koh N.L., Latunde-Dada G.O. // Pharmaceuticals. 2018. Vol. 11. P. 111. doi 10.3390/ph11040111
26. Marino T., Toscano M., Russo N., Grand A. // J. Phys. Chem. (B). 2006. Vol. 110. P. 24666. doi 10.1021/jp0645972
27. Carter P. // Anal. Biochem. 1971. Vol. 40. P. 450. doi 10.1016/0003-2697(71)90405-2

Pro(anti)oxidant Properties of Amino Acids and Their Derivatives in The Presence of Fe²⁺ and Cu²⁺ Ions

O. A. Milach^a, I. V. Mel'sitova^a, and I. L. Yurkova^{a,b,*}

^a Belarussian State University, 220030 Belarus

^b Research Institute of Physicochemical Problems, Belarussian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: yurkovail@tut.by

Received February 10, 2020; revised February 10, 2020; accepted February 16, 2020

Fluorescent probe, terephthalic acid, was used for rapid analysis of the ability of amino acids and their derivatives to accept and/or promote the formation of HO[•] radicals in the Cu²⁺-H₂O₂, Fe²⁺/EDTA-H₂O₂ systems. In the concentration range of 0.005–30 mM., according to the increase in IC₅₀, amino acids are ranked as follows: Trp < Phe ≤ Met ≤ His < Gly ≤ Glu < α-Ala < Cys << β-Ala << Tau (system with Cu²⁺); His ≤ Met < Trp ≤ Cys << β-Ala < Tau ≤ Glu < α-Ala < Gly (system with free Fe²⁺). In the presence of copper(II), Cys and its derivatives, Glu, α-Ala, His (S) intensify HO[•] formation, and act as antioxidants in molar ratio of S:Cu²⁺ > 2:1, only for His this ratio is ≥1:1. Cys is also a prooxidant in the system with Fe²⁺/EDTA.

Keywords: amino acid, hydroxyl radical, prooxidant, Fe²⁺(Cu²⁺) ion, fluorescent probe, radical scavenging activity