

ГЛИЦИН И ГИСТИДИН В РЕГУЛИРОВАНИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ДЕФОСФОРИЛОВАНИЯ ГЛИЦЕРОФОСФАТА В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ Cu^{2+} (Fe^{2+})

© 2022 г. О. А. Милач^а, В. Э. Найденев^с, Е. Г. Каранкевич^с, И. Л. Юркова^{а,б,*}

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

^б Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220006 Беларусь

^с Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

*e-mail: yurkovail@tut.by

Поступило в Редакцию 2 ноября 2021 г.

После доработки 16 декабря 2021 г.

Принято к печати 23 декабря 2021 г.

Изучено влияние глицина и гистидина на гомолитическую фрагментацию глицерофосфата с разрывом фосфоэфирной связи, индуцированную редокс-системами Fe^{2+} (Cu^{2+})– H_2O_2 или γ -излучением. В условиях Cu^{2+} -опосредованного генерирования радикалов HO^\bullet Gly и His при молярном соотношении аминокислота– Cu^{2+} (1.6:1)–(3:1) усиливают фрагментацию, при соотношении $\geq 5:1$ – ингибируют. Комплекс $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ в присутствии H_2O_2 индуцирует деструкцию глицерофосфата в зависимости от концентрации. В присутствии Fe^{2+} влияние Gly отсутствует, His ускоряет фрагментацию более чем в 2 раза при увеличении его концентрации в системе. На радиационно-индуцированную фрагментацию Gly не влияет, а ингибирование ее гистидином зависит от концентрации последнего.

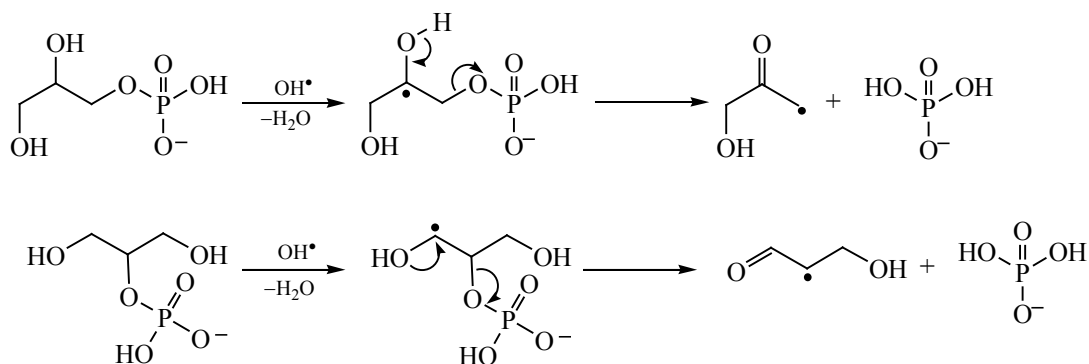
Ключевые слова: глицин, гистидин, глицерофосфат, про/антиоксидант, свободно-радикальная фрагментация, ионы Fe^{2+} (Cu^{2+})

DOI: 10.31857/S0044460X22020135

В последнее время интенсивно изучаются процессы с участием свободных радикалов, играющих ключевую роль в физиологических и патологических состояниях. Сдвиг баланса между антиоксидантами и активными формами кислорода (O_2^\bullet , H_2O_2 , HClO , HO^\bullet , $^1\text{O}_2$) в пользу последних определяется как окислительный стресс [1–3]. Высокий уровень активных форм кислорода индуцирует повреждение и дисфункцию ключевых молекул (липиды, белки, ДНК), что приводит к нарушению жизненно важных процессов в клетках. Окислительный стресс тесно связан с развитием многочисленных заболеваний (нейродегенеративные, сердечно-сосудистые, инфекционные, онкологические, аутоиммунные и др.) [1–5].

Окислительный стресс можно рассматривать как совокупность химических процессов, протекающих в биосистеме в различных условиях с участием самых разных химических соединений и конкурирующих реакций. Для понимания механизма развития и путей регулирования свободно-радикальных реакций в клетках необходим мультидисциплинарный подход. Исследования *in vivo* дают представления о конечном результате окислительного стресса, а опыты *in vitro* представляют собой упрощенную систему реальных процессов, позволяют получить детальную информацию о химизме реакций и оценить возможность их протекания.

Схема 1.



При определении вклада глицерофосфолипидов в механизмы развития окислительного стресса и способов его регулирования преимущественно учитывают перекисное окисление липидов в гидрофобной части липидной мембраны. При взаимодействии радикалов HO^\bullet с амфифильными молекулами глицерофосфолипидов, несущими гидроксильные группы, (фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин, лизофосфатидилглицерин, кардиолипин) в полярных фрагментах реализуется свободнорадикальная фрагментация [6]. Она протекает через стадию образования углерод-центрированных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OR}^1)\text{C}^\bullet(\text{OH})\text{H}_2\text{COP}(\text{O})\text{O}_2\text{R}^{2-}$ (R^1, R^2 – фрагменты молекулы), распадающихся с разрывом фосфоэфирной связи и элиминированием фосфатидной кислоты – вторичного мессенджера в биосистемах [7].

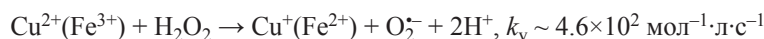
Свободнорадикальная фрагментация глицерофосфолипидов реализуется *in vitro* и *in vivo* в условиях металл-опосредованного генерирования активных форм кислорода [8–10]. Она характерна для фосфоэфиров глицерина (глицеро-1-фосфат, глицеро-2-фосфат), которые могут быть использованы в качестве модельных соединений глицерофосфолипидов. D-Глицеро-1-фосфат представляет собой важный компонент клетки, участвующий не только в синтезе липидов, но и в некоторых метаболических процессах. При действии систем, генерирующих радикалы HO^\bullet , на водные растворы глицерофосфатов (схема 1) разрыв фосфоэфирной связи в молекулах происходит преимущественно за счет фрагментации первичных радикалов $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{C}^\bullet(\text{OH})\text{H}_2\text{COP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2^-$ и $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{HC}^\bullet[\text{OP}(\text{O})$

$\text{O}_2\text{H}_2]\text{C}^\bullet\text{H}(\text{OH})$ $\{\text{HC}^\bullet(\text{OH})\text{HC}[\text{OP}(\text{O})\text{O}_2\text{H}_2]\text{CH}_2(\text{OH})\}$ [11, 12]. Свободнорадикальное дефосфорилирование глицеро-1-фосфата и глицеро-2-фосфата протекает с высокой скоростью ($k_v > 10^6 \text{ c}^{-1}$) [11] и моделирует деструкцию глицерофосфолипидов с разрывом фосфоэфирной связи в полярной части биомембран.

Глицин (Gly) и гистидин (His) – аминокислоты с уникальными биохимическими и физиологическими свойствами – являются не только строительными блоками белков, но и предшественниками многих ключевых низкомолекулярных соединений: креатина, глутатиона, пуринов и порфиринов (Gly), гистамина и карнозина (His).

Глицин (pI 6.06) служит нейромедиатором, проявляет противовоспалительные, цитопротекторные и иммуномодулирующие свойства. Введение глицина используют в профилактике многих заболеваний и патологий, включая рак [13, 14]. При изучении механизма действия глицина в различных экспериментальных моделях установлено [15], что он играет важную роль в регулировании окислительного стресса, опосредованного свободными радикалами. Глицин демонстрировал антиоксидантный эффект, снижал уровень активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов, обладал мембранопротекторным действием [15, 16]. Однако в больших количествах глицин оказывал прооксидантное действие, интенсифицировал образование активных форм кислорода и индуцировал перекисное окисление липидов [17, 18].

Схема 2.



Гистидин (pI 7.64, pK_a 6.04) проявляет буферные свойства и способность хелатировать ионы металлов. His и включающие его пептиды интенсивно исследуются с целью их применения для коррекции различных расстройств и заболеваний, в том числе, инфекционных [19, 20]. Роль His в физиологической антиоксидантной системе может быть обусловлена его способностью взаимодействовать с активными формами кислорода (HO^{\cdot} , $^1\text{O}_2$), образовывать комплексы с ионами переходных металлов и препятствовать их участию в окислительно-восстановительных реакциях [19–22]. Данные о роли His в регуляции окислительного стресса фрагментарны и противоречивы. Гистидин может проявлять прооксидантную активность, способствуя повреждению биомолекул в присутствии ионов переходных металлов [23–27].

Нами изучено влияние Gly и His на $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -опосредованную свободнорадикальную фрагментацию глицеро-2-фосфата с разрывом фосфоэфирной связи и элиминированием неорганического фосфата.

Ионы переходных металлов (Fe^{2+} , Cu^+ и др.) играют важную роль в развитии окислительного стресса в организме [2]. Они катализируют разложение H_2O_2 с образованием частиц HO^{\cdot} (схема 2), вносящих основной вклад в образование первичных радикалов глицерофосфата, и поэтому для индукции свободнорадикальной фрагментации глицерофосфата были выбраны редокс-системы $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})-\text{H}_2\text{O}_2$.

При исследовании влияния глицина (c 1.7×10^{-5} – 1×10^{-3} моль/л) на дефосфорилирование глицерофосфата в условиях Cu^{2+} -опосредованного генерирования HO^{\cdot} обнаружена инверсия эффекта аминокислоты. Глицин в самой низкой концентрации (0.017 ммоль/л) исследованного диапазона не оказывает статистически значимого эффекта на фрагментацию в сравнении с контролем. С увели-

чением концентрации глицина в диапазоне 0.08–0.17 ммоль/л при молярном соотношении Gly– Cu^{2+} от 1.6:1 до 3:1 наблюдается усиление фрагментации глицерофосфата. При соотношении Gly: $\text{Cu}^{2+} \geq 5:1$ аминокислота оказывает протекторное действие, усиливающееся с увеличением ее концентрации в системе (рис. 1).

Глицин имеет хорошую аффинность по отношению к ионам Cu^{2+} , координационное число (КЧ) 4 или 6, и Cu^+ (КЧ 2 или 4) [28, 29]. Про/антиоксидантный эффект Gly можно объяснить формированием комплексов с медью с различной координацией/количеством лиганда и их различной реакционной способностью по отношению к H_2O_2 .

При соотношении Gly: $\text{Cu}^{2+} < 3:1$ координация глицина с ионами Cu^{2+} способствует их восстановлению до ионов Cu^+ . Последние участвуют в

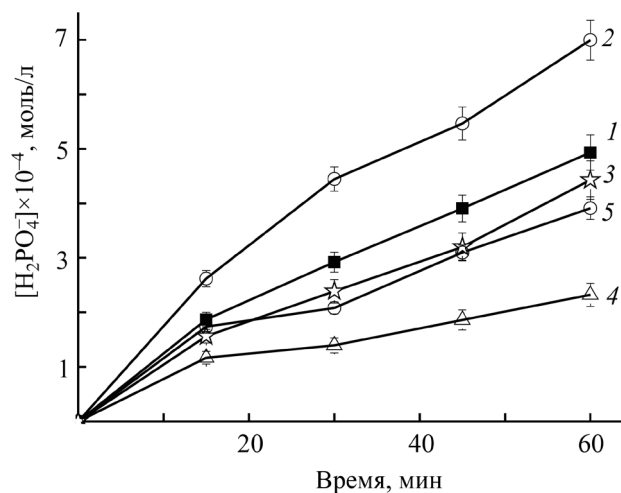


Рис. 1. Накопление H_2PO_4^- в водном растворе глицеро-2-фосфата (c 25×10^{-3} моль/л), инкубированном при 37°C с $\text{Cu}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$ (0.05:15 ммоль/л) и глицином (1 – 0, 2, 5 – 0.1, 3 – 0.25, 4 – 0.5 ммоль/л), без добавок (1–4) и в присутствии 5.0 ммоль/л NaN_3 (5).

каталитическом разложении H_2O_2 и повышают уровень HO^\bullet . На это указывает снижение активирующего действия глицина в присутствии азид-натрия, который взаимодействует с радикалами HO^\bullet с высокой константой скорости ($1.1 \times 10^{10} \text{ мол}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ [30]), превращаясь в азидил-радикал (N_3^\bullet) – более слабый окислитель, чем HO^\bullet {редокс-потенциал $E(\text{N}_3^\bullet/\text{N}_3^-)$ 1.33 В, $E(\text{HO}^\bullet, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O})$ 2.73 В [31]}. Кроме того, радикалы N_3^\bullet быстро диспропорционируют ($2k_v$ $9 \times 10^9 \text{ мол}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$). Реакции NaN_3 с O_2 и H_2O_2 при нейтральном pH среды не эффективны ($k_v < 10^6 \text{ мол}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$, pH 7.0) [30]. Полученные результаты согласуются со значительным усилением $\text{Cu(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$ -опосредованного окисления хиनाльдинового синего при введении глицина, что объясняется образованием радикалов HO^\bullet [32]. Для объяснения усиления каталитической активности различных комплексов с Cu(II) по отношению к H_2O_2 предлагаются разные молекулярные механизмы [33].

Предположение, что активирующий эффект Gly на фрагментацию глицерофосфата обусловлен появлением радикалов HO^\bullet , подтверждается данными о влиянии Gly на уровень HO^\bullet в редокс-системе $\text{Cu}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$, полученными нами методом флуоресцентных зондов. В присутствии Gly (c 8×10^{-5} – 5×10^{-4} моль/л) при молярном соотношении $\text{Gly}:\text{Cu}^{2+} \leq 2:1$ количество HO^\bullet в системе повышается в 1.15–1.2 раза при различных концентрациях меди (0.025, 0.05, 0.075, 0.1 ммоль/л; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 15$ ммоль/л во всех случаях). При увеличении концентрации Gly (соотношение $\text{Gly}:\text{Cu}^{2+} > 2:1$) количество HO^\bullet снижается, что согласуется с данными нашей работы [34].

Определенный вклад в активацию $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -опосредованной фрагментации глицерофосфата в присутствии аминокислот может вносить сайт-специфический механизм, предложенный для металл-катализируемого окисления белков [35]. Возможно образование комплекса аминокислота– Cu^{2+} –глицерофосфат, способного реагировать с H_2O_2 . В этом случае радикалы HO^\bullet образуются в непосредственной близости к сайту связывания и более эффективны в повреждении глицерофосфата, чем частицы, образующиеся в толще раствора. Формированием тройного комплекса ДНК– Cu^{2+} –лиганд и реализацией сайт-специфического меха-

низма объясняют ускорение повреждения ДНК в присутствии различных лигандов [36].

Глицин при увеличении его концентрации и молярного соотношения $\text{Gly}-\text{Cu}^{2+}$ оказывает протекторное действие (рис. 1). В данном случае такой эффект можно скорее объяснить способностью глицина хелатировать $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ (образование хелата препятствует восстановлению меди и/или ее участию в катализе, схема 2), чем его радикал-акцепторными свойствами. Скорость реакции Gly с HO^\bullet невысока (k_{vHO^\bullet} $1.7 \times 10^7 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$, pH 5.8–6.0 [37]), поэтому в малых количествах в сравнении с субстратом Gly не может быть эффективным акцептором, способным конкурировать с глицерофосфатом, реагирующим с HO^\bullet с большой скоростью (k_{vHO^\bullet} $1 \times 10^{10} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$, pH ~ 7.0 [37]). Это согласуется с влиянием Gly на γ -индуцированную свободнорадикальную фрагментацию глицерофосфата. Физический способ иницирования позволяет исключить влияние на фрагментацию взаимодействия аминокислот с ионами переходных металлов. Образование радикалов HO^\bullet , инициирующих дефосфорилирование глицерофосфата при γ -облучении его водных растворов, происходит вследствие радиолиза H_2O (косвенное действие ионизирующего излучения). Глицин в концентрациях 1.0, 2.0, 10.0 ммоль/л не оказывает существенного радиопротекторного эффекта на фрагментацию глицерофосфата (c 100 ммоль/л) в сравнении с контролем. Радиационно-химический выход фосфат-аниона $G(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$ без добавок Gly составил 3.39 ± 0.48 , в присутствии 10 ммоль/л Gly – 3.30 ± 0.40 молекула/100 эВ. В то же время цистеин и гистидин $\{k_{\text{vHO}^\bullet}$ 3.4×10^{10} (pH 5.8–7) и $(0.5-1.3) \times 10^{10}$ (pH 4–7) $\text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно [37]\}, взятые для сравнения, ингибировали фрагментацию глицерофосфата концентрационно-зависимым образом в присутствии 10.0 ммоль/л Cys $G(\text{H}_2\text{PO}_4^-) = 1.01 \pm 0.15$, в присутствии His $G(\text{H}_2\text{PO}_4^-) = 1.27 \pm 0.19$ молекула/100 эВ.

Диглицинат меди $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ используют в качестве органического источника микроэлемента для профилактики заболеваний у людей, а также для повышения продуктивности в птице- и животноводстве. Однако знания о его действии на молекулярном уровне ограничены. Инкубирование гли-

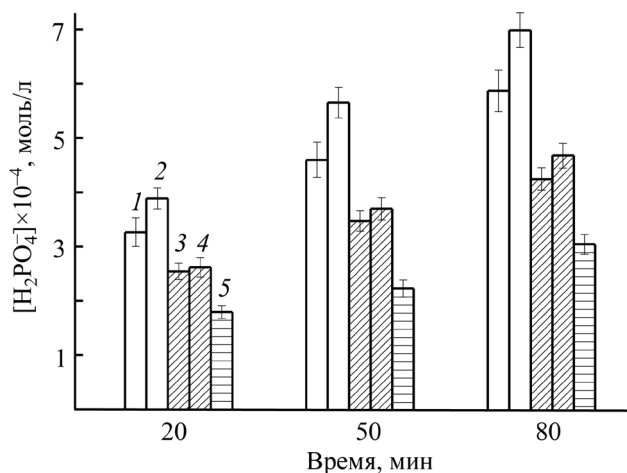


Рис. 2. Накопление H_2PO_4^- в водном растворе глицеро-2-фосфата ($c\ 25 \times 10^{-3}$ моль/л), инкубированном при 37°C с H_2O_2 (10 ммоль/л) и CuGly_2 (1, 3, 5 – 1.0, 2, 4 – 2.0 ммоль/л), без добавок (1, 2) и в присутствии 2.0 ммоль/л NaN_3 (3, 4), 2.0 ммоль/л метионина (5).

церофосфата с $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ и H_2O_2 сопровождается деструкцией субстрата с разрывом фосфоэфирной связи (рис. 2). Это объясняется тем, что ионы Cu^{2+} , высвобождаясь из комплекса, реагируют с H_2O_2 с образованием радикалов HO^\bullet , которые инициируют фрагментацию глицерофосфата. Это подтверждается снижением уровня фосфат-аниона при одновременном введении азиды натрия, обладающего высокой антирадикальной активностью (рис. 2).

Фрагментация глицерофосфата, опосредованная редокс-системой $\text{Cu}(\text{Gly})_2\text{-H}_2\text{O}_2$, в большей степени подавляется метионином. Защитное действие Met обусловлено не только его высокой HO^\bullet -акцепторной активностью ($k_{\text{vHO}^\bullet} \cdot 8.3 \times 10^9$ моль $^{-1}$ ·л·с $^{-1}$, pH 6–7 [37]), но и способностью хелатировать $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ [29]. Аффинность Met по отношению к $\text{Cu}(\text{I})$ выше, чем у Gly [38]. Увеличение внутриклеточной генерации активных форм кислорода при введении $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ и развитие окислительного стресса наблюдали при исследовании токсичности различных источников меди *in vitro* [39].

При изучении действия Gly на Fe^{2+} -опосредованную фрагментацию глицерофосфата не выявлено значительного про/антиоксидантного

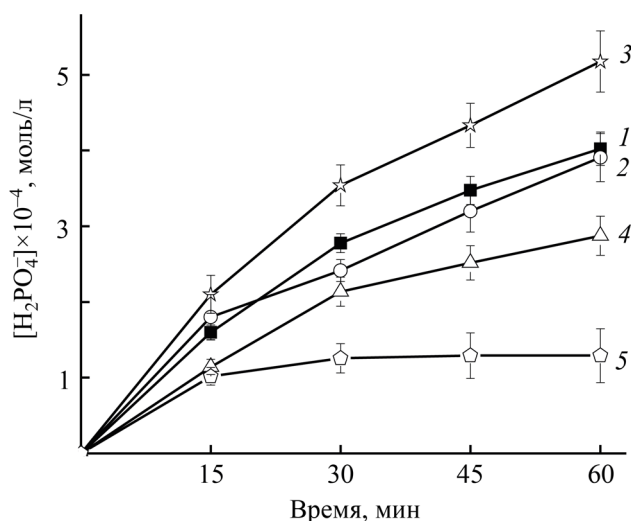


Рис. 3. Накопление H_2PO_4^- в водном растворе глицеро-2-фосфата ($c\ 25 \times 10^{-3}$ моль/л), инкубированном с $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (0.05/15 ммоль/л) при 37°C , с добавкой гистидина: 1 – 0, 2 – 0.017, 3 – 0.10, 4 – 0.25, 5 – 0.83 ммоль/л.

эффекта аминокислоты. Дефосфорилирование глицерофосфата в его водном растворе ($c\ 25$ ммоль/л), инкубированном с редокс-системами $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ (0.5:10 ммоль/л) или FeSO_4 -этилендиаминтетрауксусная кислота- H_2O_2 (0.5:0.5:10 ммоль/л) при 37°C , в присутствии Gly ($c\ 5 \times 10^{-5}$ – 1×10^{-3} моль/л) статистически значимо не отличается от контроля. Только при увеличении концентрации Gly до 5.0 ммоль/л обнаруживается снижение концентрации фосфат-аниона (в ~ 1.25 раза). Такое действие Gly можно объяснить тем, что он хелатирует $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ слабее, чем ионы меди [40, 41], и обладает, как указано выше, низкой HO^\bullet -акцепторной активностью. Полученные результаты согласуются с установленной нами ранее способностью глицина регулировать количество радикалов HO^\bullet в Fe^{2+} -содержащих редокс-системах. Величина IC_{50} для глицина в системах $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ и FeSO_4 -этилендиаминтетрауксусная кислота- H_2O_2 составила 24.8 ± 1.70 и >30.0 ммоль/л соответственно, в то время как в системе $\text{CuSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ IC_{50} 0.158 ± 0.015 ммоль/л [34].

Действие гистидина ($c\ 1.7 \times 10^{-5}$ – 0.85×10^{-3} моль/л) на Cu^{2+} -опосредованную фрагментацию глицерофосфата с разрывом фосфоэфирной связи неоднозначно. Для His, как и для Gly, наблю-

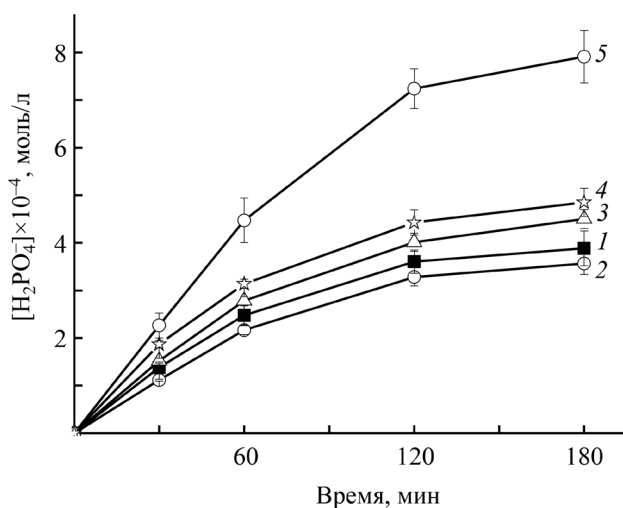


Рис. 4. Накопление H_2PO_4^- в водном растворе глицеро-2-фосфата ($c = 25 \times 10^{-3}$ моль/л), инкубированном с $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (0.5/10 ммоль/л) при 37°C , с добавкой гистидина: 1 — 0, 2 — 0.1, 3 — 0.5, 4 — 1.0, 5 — 2.0 ммоль/л.

дается инверсия его эффекта с прооксидантного на антиоксидантный (рис. 3). Гистидин в диапазоне концентраций 0.08–0.17 ммоль/л при молярном соотношении $\text{His}:\text{Cu}^{2+}$ от 1.7:1 до 2.5:1 усиливает деструкцию глицерофосфата, а при соотношении $\text{His}-\text{Cu}^{2+} \geq 5:1$ аминокислота действует как протектор. При равных концентрациях (0.1 ммоль/л) His активизирует фрагментацию слабее (в ~ 1.15 раза), чем глицин (в ~ 1.4 раза) ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ моль/л).

С одной стороны, гистидин при определенных соотношениях с ионами меди способен интенсифицировать образование HO^\bullet в системе $\text{CuSO}_4-\text{H}_2\text{O}_2$ [34]. Такой эффект гистидин проявляет в более узком концентрационном диапазоне, чем другие аминокислоты, и при увеличении концентрации обнаруживает высокую антирадикальную активность ($\text{IC}_{50} = 0.078 \pm 0.007$ ммоль/л). С другой стороны, His обладает высокой реакционной способностью по отношению к радикалам HO^\bullet и может эффективно их акцептировать, тем самым препятствуя атаке на молекулы глицерофосфата. Это подтверждается данными по влиянию His на γ -индуцированную фрагментацию глицерофосфата.

В антиоксидантный эффект гистидина частично свой вклад может вносить хелатирование Cu^{2+} в неактивный комплекс. Гистидин с участием аминного, имидазольного и карбоксильного фрагмен-

тов способен взаимодействовать с ионами металлов и образовывать стабильные комплексы [19, 21, 42–44], константа связывания гистидина с $\text{Cu}(\text{II})$ $K_a = 71.14$ моль $^{-1}$ ·л [43].

В совокупности действие гистидина, как и глицина, на фрагментацию глицерофосфата обусловлено балансом его способности акцептировать активные радикалы HO^\bullet и образовывать различные комплексы с ионами меди и тем самым влиять на их участие в окислительно-восстановительных реакциях с образованием HO^\bullet .

В условиях Fe^{2+} -опосредованного образования HO^\bullet гистидин ($c = 5.0 \times 10^{-5} - 5.0 \times 10^{-3}$ моль/л) не оказывает значимого ингибирующего влияния на фрагментацию глицерофосфата, но значительно ускоряет фрагментацию при увеличении концентрации (рис. 4). В присутствии 2.0 ммоль/л His образование фосфат-аниона увеличивается в ~ 1.9 раз.

His оказывал активирующее действие на железо-опосредованные деструкцию ДНК [25–27] и перекисное окисление липидов [23, 24]; максимальный эффект наблюдался при высоком молярном соотношении $\text{His}-\text{Fe}^{2+}$ [25].

Методом флуоресцентных зондов нами выявлено, что His не повышает уровень HO^\bullet в системах с $\text{Fe}(\text{II})$, хотя в присутствии Cu^{2+} обнаруживает некоторое активирующее действие [34]. Величина IC_{50} для His в системе $\text{FeSO}_4-\text{H}_2\text{O}_2$ (0.038 ± 0.004 ммоль/л) минимальна в сравнении с индексами для других аминокислот, поэтому активирующее действие His на фрагментацию глицерофосфата проблематично связать с увеличением пула свободных HO^\bullet в его присутствии.

Гистидин (49%), как и субстрат – глицерофосфат (92%), обладают высокой Fe^{2+} -хелатирующей активностью (контроль – этилендиаминтетрауксусная кислота, 99 %) [34]. Это согласуется с высоким сродством гистидина в больших концентрациях к Fe^{2+} при нейтральном pH [19]. Гистидин способен образовывать аддукты с H_2O_2 , что способствует ее разложению в присутствии $\text{Fe}(\text{II})$ (pH 7.0) [45].

Учитывая вышеизложенное, прооксидантный эффект His на Fe^{2+} -опосредованную фрагментацию глицерофосфата может быть обусловлен реализацией сайт-специфического механизма [35].

Одновременное связывание глицерофосфата, ионов Fe^{2+} и His может способствовать генерации HO^\bullet в непосредственной близости от молекул глицерофосфата и усиливать его деструкцию. При реализации такого механизма эффективные HO^\bullet -акцепторы не ингибируют свободнорадикальное окисление в значительной мере, так как, вероятно, не могут конкурировать с заключенной в клетку реакцией HO^\bullet с субстратом на стороне связывания металла [35]. С этим согласуются данные [25], полученные методом ЭПР с использованием спиновой ловушки (5,5-диметилпирролин-1-оксид). Сигнал, соответствующий аддукту спиновой ловушки и HO^\bullet , значительно снижался с увеличением концентрации His в системе $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ и практически исчезал при молярном соотношении $[\text{His}]:[\text{Fe(II)}] = 10^3$ [25]. Это указывает на то, что свободные радикалы HO^\bullet недоступны для связывания со спиновой ловушкой в системе His–Fe(II)– H_2O_2 . На основании данных ЭПР предполагается, что в системе Cu(II)–лиганд– H_2O_2 образуются различные типы радикалов HO^\bullet – свободный и связанный [46], последний более эффективен в окислении органических молекул.

Влияние гистидина на фрагментацию глицерофосфата, индуцированную $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ может быть обусловлено протеканием различных взаимодействий в зависимости от условий и реализоваться по разным механизмам, что требует дополнительных исследований.

Таким образом, в условиях $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -опосредованного генерирования радикалов HO^\bullet глицин и гистидин различным образом регулируют свободнорадикальную фрагментацию глицерофосфата с разрывом фосфоэфирной связи. В присутствии Cu^{2+} эффект глицина и гистидина изменяется с активирующего на протекторный. В присутствии Fe^{2+} гистидин стимулирует фрагментацию с увеличением концентрации в системе, глицин в таком же диапазоне концентраций не оказывает значимого влияния. Про/антиоксидантный эффект Gly и His на $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ -опосредованную фрагментацию глицерофосфата обусловлен балансом их HO^\bullet -акцепторных, восстановительных и комплексообразующих свойств. Полученные результаты важны для понимания молекулярных механизмов действия аминокислот в регулировании свободнорадикальных реакций в биомембране в присутствии ионов переходных металлов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали L-цистеин (Cys), L-метионин (Met), L-гистидин (His), глицин (Gly), динатриевую соль глицеро-2-фосфата, терефталевую кислоту (Sigma-Aldrich, Германия); азид натрия (NaN_3), гидропероксид, соли металлов ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), однозамещенный фосфат калия производства ЗАО «Вектон» (Россия). Все реактивы и растворители имели аналитическую степень чистоты. Водные растворы готовили на деионизированной воде.

ИК спектры получали на ИК Фурье-спектрофотометре Protege 460 Nicolet в таблетках KBr. Элементный анализ проводили на CHNOS-элементном анализаторе Vario MICRO Elementar Analysensysteme GmbH (три последовательности с точностью взвешивания 0.000001 г на весах Mettler Toledo). Количество меди в образце диглицината меди определяли титриметрическим методом.

Для обработки полученных экспериментальных результатов применяли методы математической статистики, включая встроенные в компьютер статистические функции программ Excel и Origin. Достоверность полученных результатов контролировали с помощью *t*-теста Стьюдента. В каждой экспериментальной серии проводили 3–5 параллельных опытов. На рисунках каждый результат представлен как среднее значение $\pm\text{SD}$, статистически отличное в сравнении с контролем ($p < 0.05$).

Методы иницирования свободнорадикальных процессов. а. Физическое иницирование с помощью γ -излучения. Водные растворы глицеро-2-фосфата (pH 7.0) с добавками или без добавок помещали в стеклянные ампулы, 60 мин пропускали аргон (99.9 %), затем ампулы запаивали и облучали на γ -установке МРХ-гамма-25М с источником излучения ^{60}Co . Для определения мощности поглощенной дозы использовали ферросульфатный дозиметр Фрике [$G(\text{Fe}^{3+}) = 15.5$ частица/100 эВ]. Мощность поглощенной дозы установки составляла 0.11 ± 0.01 Гр/с, интервал поглощенных доз – (0–1.6) кГр. Облучение образцов проводили при комнатной температуре (20 ± 2)°С.

б. Химическое иницирование свободнорадикальных процессов проводили с помощью редокс-систем $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})\text{-H}_2\text{O}_2$, генерирующих HO^\bullet .

К растворам глицеро-2-фосфата (pH 7.0) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и H_2O_2 , концентрация которых указана в подписях к рисункам. Тестируемые вещества вводили в раствор субстрата до добавления компонентов редокс-систем. Образцы тщательно перемешивали с использованием прибора Vortex mixer после добавления каждого реагента и термостатировали при 37 °C в течение заданного времени.

Анализ неорганического фосфата в растворах глицерофосфата. Фосфат-анион в растворах глицерофосфата (pH 7.0) определяли фотоколориметрически по модифицированной методике [47]. В основе анализа использовали цветную реакцию фосфат-аниона с молибдатом аммония. К 0.2 мл исследуемой пробы добавляли 1 мл воды, 1 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (1.8 %-ный раствор в 2 н. H_2SO_4) и 0.2 мл раствора FeSO_4 (10%-ный раствор в 0.15 н. H_2SO_4). Полученный раствор фотометрировали относительно холостой пробы при λ 720 нм. Концентрацию H_2PO_4^- – продукта свободно-радикальной фрагментации глицерофосфата – рассчитывали по калибровочной кривой. Для приготовления калибровочных растворов использовали однозамещенный фосфат калия, высушенный до постоянной массы при 110°C. Навески KH_2PO_4 растворяли в растворе глицерофосфата (c 25×10^{-3} моль/л), диапазон концентраций растворов 0–2.0 ммоль/л.

Определение антирадикальной активности соединений. Способность соединений опосредовать образование радикалов HO^\bullet или акцептировать их в системах $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})-\text{H}_2\text{O}_2$ определяли с помощью молекулярного зонда – терефталевой кислоты, образующей с HO^\bullet гидрокситерефталат, обладающий флуоресценцией $\lambda_{\text{возб}}$ 315 нм, $\lambda_{\text{эм}}$ 418 нм [48]. В соответствии со стехиометрией реакции концентрация радикалов HO^\bullet прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции гидрокситерефталата. HO^\bullet -активность соединений оценивали по их влиянию на кинетику гидроксирования терефталевой кислоты и по индексу IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования, ммоль/л). Детальное изложение методики эксперимента см. [34]. Спектры флуоресценции в диапазоне длин волн 350–550 нм получали на спектрофлуориметре Solar CM2203.

Диглицинат меди(II), $\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO})_2$. Моногидрат диглицината меди(II) $\text{Cu}(\text{Gly})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ получали по известной методике [49]. К раствору 5.0 г (0.066 моль) глицина в 35 мл воды добавляли 2.64 г (0.066 моль) NaOH в течение 10 мин и нагревали до 60°C. К гомогенному раствору небольшими порциями добавляли 8.2 г (0.033 моль) сульфата меди(II), перемешивали 20 мин при 50°C. Реакционную смесь охлаждали до 7–10°C. Выпавший кристаллический осадок отфильтровывали, промывали холодной водой, этиловым спиртом и сушили. Степень чистоты 99.7%. Выход 88%, т. пл. 265–266°C. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3261 (N–H), 1603 (C=O), 1059 (C–N), 1035 (C–N), 475 (Cu–N), 455 (Cu–N). Найдено, %: C 21.01; H 4.36; N 12.11; Cu 27.78. $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{CuN}_2\text{O}_5$. Вычислено, % C 20.92; H 4.39; N 12.19; Cu 27.67.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Юркова Ирина Леонидовна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0790-0792>

Найдёнов Владимир Эдгарович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4624-4049>

Каранкевич Елена Григорьевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0777-5517>

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках задания Государственных программ научных исследований Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганическая химия» (проект № 2.2.03.04).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. Vol. 2017. P. 8416763. doi 10.1155/2017/8416763
2. 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
3. Pisoschi A.M., Pop A. // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 97. P. 55. doi 10.1016/j.ejmech.2015.04.040

4. *Forman H.J., Zhang H.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2021. Vol. 20. P. 689. doi 10.1038/s41573-021-00233-1
5. *Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P.* // Clin. Interv. Aging. 2018. Vol. 13. P. 757. doi org/10.2147/CIA.S158513
6. *Юркова И.Л.* // Усп. хим. 2012. Т. 81. № 2. С. 175; *Yurkova I.L.* // Russ. Chem. Rev. 2012. Vol. 81. N 2. P. 175. doi 10.1070/RC2012v081n02ABEH004205
7. *Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R.* // Prog. Lipid Res. 2006. Vol. 45. P. 250. doi 10.1016/j.plipres.2006.01.005
8. *Yurkova I.L., Stuckert F., Kisel M.A., Shadyro O.I., Arnhold J., Dominik H.* // Arch. Biochem. Biophys. 2008. Vol. 480. N 1. P. 17. doi 10.1016/j.abb.2008.09.007
9. *Yurkova I., Arnhold J., Huster D.* // Chem. Phys. Lipids. 2009. Vol. 158. N 1. P. 16. doi 10.1016/j.chemphyslip.2008.09.005
10. *Yurkova I.L., Arnhold J., Fitzl G., Huster D.* // Chem. Phys. Lipids. 2011. Vol. 164. P. 393. doi 10.1016/j.chemphyslip.2011.05.006
11. *Schuchmann M.N., Scholes M.L., Zegota H., von Sonntag C.* // Int. J. Radiat. Biol. 1995. Vol. 68. N 2. P. 121. doi 10.1080/09553009514551021
12. *Кисель М.А., Шадыро О.И., Юркова И.Л.* // Химия высоких энергий. 1997. Т. 31. № 2. С. 99; *Kisel M.A., Shadyro O.I Yurkova I.L.* // High Energy Chemistry. 1997. Т. 31. N 2. P. 80.
13. *Wang W., Wu Z., Dai Z., Yang Y., Wang J., Wu G.* // Amino Acids. 2013. Vol. 45. N 3. P. 463. doi 10.1007/s00726-013-1493-1
14. *Razak M.A., Begum P.S., Viswanath B., Rajagopal S.* // Oxid. Med. Cell Longev. 2017. Vol. 2017 (1716701). doi 10.1155/2017/1716701
15. *Heidari R., Ghanbarinejad V., Mohammadi H., Ahmadi A., Ommati M.M., Abdoli N., Aghaei F., Esfandiari A., Azarpira N., Niknahad H.* // Biomed. Pharmacother. 2018. Vol. 97. P. 1086. doi 10.1016/j.biopha.2017.10.166.
16. *Senthilkumar R., Sengottuvelan M., Nalini N.* // Cell Biochem. Funct. 2004. Vol. 22. P. 123. doi 10.1002/cbf.1062
17. *Moura A.P., Grings M., Marcowich G.F., Bumbel A.P., Parmeggiani B., de Moura Alvorcem L., Wajner M., Leipnitz G.* // Mol. Cell Biochem. 2014. Vol. 395. N 1–2. P. 125. doi 10.1007/s11010-014-2118-z
18. *Leipnitz G., Solano A.F., Seminotti B., Amaral A.U., Fernandes C.G., Beskow A.P., Dutra Filho C.S., Wajner M.* // Cell Mol. Neurobiol. 2009. Vol. 29. N 2. P. 253. doi 10.1007/s10571-008-9318-6
19. *Vera-Aviles M., Vantana E., Kardinasari E., Koh N.L., Latunde-Dada G.O.* // Pharmaceuticals (Basel). 2018. Vol. 11. N 4. P. 111. doi 10.3390/ph11040111
20. *Holeček M.* // 2020. Nutrients. Vol. 12. N 3. P. 848. doi 10.3390/nu12030848
21. *Nair N.G., Perry G., Smith M.A., Reddy V.P.* // J. Alzheimers Dis. 2010. Vol. 20. P. 57. doi 10.3233/JAD-2010-1346
22. *Wade A. M., Tucker H. N.* // J. Nutr. Biochem. 1998. Vol. 9. P. 308. doi 10.1016/S0955-2863(98)00022-9
23. *Babizhayev M.A., Seguin M.C., Gueyne J., Evstigneeva R.P., Ageyeva E.A., Zheltukhina G.A.* // Biochem J. 1994. Vol. 304. P. 509. doi 10.1042/bj3040509
24. *Erickson M.C., Hultin H.O.* // Arch Biochem Biophys. 1992. Vol. 292. P. 427. doi 10.1016/0003-9861(92)90012-1
25. *Tachon P., Deflandre A., Giacomoni P.U.* // Carcinogenesis. 1994. Vol. 15. P.1621. doi 10.1093/carcin/15.8.1621
26. *Cantoni O., Giacomoni P.* // Gen Pharmacol. 1997. Vol. 29. P. 513. doi 10.1016/s0306-3623(96)00363-1
27. *Mozdzan M., Szemraj J., Rysz J., Nowak D.* // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2005. Vol. 96. N 5. P. 352. doi10.1111/j.1742-7843.2005.pto_03.x
28. *Senapati U., Mandal B., Bankura K.P.* // Rasayan J. Chem. 2017. Vol. 10. N 3. P. 981. doi 10.7324/RJC.2017.1031798
29. *Murphy J.M.* All Dissertations 2201. 2018. 207 p.
30. *Betterton E.A.* // Crit. Rev. Env. Sci. Technol. 2003. Vol. 33. P. 423. doi 10.1080/10643380390245002
31. *Wardman P.* // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1989. Vol. 18. N 4. P. 1637. doi 10.1063/1.555843
32. *Lin T., Wu C.* // J. Catalysis. 2005. Vol. 232. N 1. P. 117. doi 10.1016/j.jcat.2005.01.038
33. *Skounas S., Methenitis C., Pneumatikakis G., Morcellet M.* // Bioinorg. Chem. Appl. 2010. Vol. 2010. P. 643120. doi 10.1155/2010/643120
34. *Милач О.А., Мельситова И.В., Юркова И.Л.* // ЖОХ. 2020. Т. 90. Вып. 6. С. 888; *Milach O.A., Mel'sitova I.V., Yurkova I.L.* // Russ. J. Gen. Chem. 2020. Vol. 90. N 6. P. 987. doi 10.1134/S1070363220060080
35. *Stadtman E.R., Levine R.L.* // Amino Acids. 2003. Vol. 25. N 3–4. P. 207. doi 10.1007/s00726-003-0011-2
36. *Goldstein S., Czapski G.* // J. Am. Chem. Soc. 1986. Vol. 108. P. 2244. doi 10.1021/ja00269a020
37. *Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B.* // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1988. Vol. 17. N 2. P. 676. doi 10.1063/1.555805
38. *Hoyau S., Ohanessian G.* // J. Am. Chem. Soc. 1997. Vol. 119. N 8. P. 2016. doi 10.1021/ja963432b
39. *Li R., Wen Y., Lin G., Meng C., He P., Wang F.* // Metabolites. 2020. Vol. 10. N 1. P. 11. doi 10.3390/metabo10010011
40. *Fazary A.E., Ramadan A.M.* // Complex Metals. 2014. Vol. 1. P. 139. doi 10.1080/2164232X.2014.941115

41. Marino T., Toscano M., Russo N., Grand A. // J. Phys. Chem. (B). 2006. Vol. 110. P. 24666. doi 10.1021/jp0645972
42. Sundberg R.J., Martin R.B. // Chem. Rev. 1974. Vol. 74. N 4. P. 471. doi 10.1021/cr60290a003
43. Velez S., Nair N.G., Reddy V.P. // Colloids Surf. (B). 2008. Vol. 66. P. 291. doi 10.1016/j.colsurfb.2008.06.012
44. Трошанин Н.В., Бычкова Т.И., Неклюдов В.В., Климовицкий А.Е. // ЖНХ. 2020. Т. 65. N 1. С. 56; Troshanin N.V., Bychkova T.I., Neklyudov V.V., Klimovitskii A.E. // Russ. J. Inorg. Chem. 2020. Vol. 65. N 1. P. 52. doi 10.1134/S0036023620010179
45. Schubert J., Wilmer J.W. // Free Rad. Biol. Med. 1991. Vol. 11. P. 545. doi 10.1016/0891-5849(91)90135-p
46. Shah V. Verma P., Stopka P., Gabriel J., Baldrian P., Nerud F. // Appl. Catal. (B). 2003. Vol. 46. P. 287. doi 10.1016/s0926-3373(03)00220-0
47. Gin F.J., Morales F. // Anal. Biochem. 1977. Vol. 77. N 1. P. 10.
48. Page S.E., Arnold W.A., McNeill K. // J. Environ. Monit. 2010. Vol. 9. N 12. P. 1658. doi 10.1039/c0em00160k
49. Кадырова Р.Г., Кабиров Г.Ф., Муллахметов Р.Р. // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2013. Т. 213. № 1. С. 109.

Glycine and Histidine in Regulation of Free Radical Dephosphorylation of Glycerophosphate in The Presence of $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})$ Ions

O. A. Milach^a, V. E. Naidenov^c, E. G. Karankevich^c, and I. L. Yurkova^{a,b,*}

^a Belarussian State University, Minsk, 220030 Belarus

^b Research Institute of Physicochemical Problems, Belarussian State University, Minsk, 220006 Belarus

^c Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Science of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

*e-mail: yurkovail@tut.by

Received November 2, 2021; revised December 16, 2021; accepted December 23, 2021

The effect of Gly and His on homolytic fragmentation of glycerophosphate with the cleavage of phosphoester bond, induced by the $\text{Cu}^{2+}(\text{Fe}^{2+})\text{-H}_2\text{O}_2$ systems or γ -radiation, has been studied. It has been shown that, under the conditions of Cu^{2+} -mediated generation of HO^\cdot , Gly and His intensify the fragmentation at a molar ratio of amino acid: Cu^{2+} between 1.6:1 to 3:1, an increase in the ratio to $\geq 5:1$ caused an inversion of the effect, and the level of phosphate anion decreased. The $\text{Cu}(\text{Gly})_2$ complex in the presence of H_2O_2 induces the fragmentation in a concentration-dependent manner. In the presence of Fe^{2+} , Gly did not significantly affect the accumulation of the fragmentation product, His accelerates the process (>2 times) with its concentration increase in the system. In the case of radiation-induced fragmentation, Gly does not affect fragmentation, His act as inhibitor in a concentration-dependent manner.

Keywords: glycine, histidine, glycerophosphate, pro/antioxidant, free-radical fragmentation, $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})$ ion